

Nachweis
vasopressinergischer Projektionen des Nucleus suprachias-
matus in Abgrenzung zu vasopressinergen
Projektionen anderer hypothalamischer
und extrahypothalamischer Neuronengruppen

Eine kombinierte immunhistochemische retrograde Transportstudie

Uwe Schrell

*Uwe
Schrell*



Aus der Anatomischen Anstalt (Mikroskopische Anatomie)
der Universität München

ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Rudolf Wetzstein

Nachweis vasopressinerner Projektionen des Nucleus suprachiasmaticus in Abgrenzung zu vasopressinergen Projektionen anderer hypothalamischer und extrahypothalamischer Neuronengruppen.

Eine kombinierte immunhistochemische retrograde Transportstudie.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Uwe Schrell
aus
Halvestorf/Hameln
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Wetzstein
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Lange
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 5. 1985

INHALT

I	INHALT	
I.1	Einleitung	1
I.2	Die Bedeutung der Dankbarkeit	2
I.3	Die Wirkung der Dankbarkeit	3
I.4	Die Methode der Dankbarkeit	4
I.5	Die Wirkung der Dankbarkeit	5
I.6	Die Wirkung der Dankbarkeit	6
I.7	Die Wirkung der Dankbarkeit	7
I.8	Die Wirkung der Dankbarkeit	8
I.9	Die Wirkung der Dankbarkeit	9
I.10	Die Wirkung der Dankbarkeit	10
I.11	Die Wirkung der Dankbarkeit	11
I.12	Die Wirkung der Dankbarkeit	12
I.13	Die Wirkung der Dankbarkeit	13
I.14	Die Wirkung der Dankbarkeit	14
I.15	Die Wirkung der Dankbarkeit	15
I.16	Die Wirkung der Dankbarkeit	16
I.17	Die Wirkung der Dankbarkeit	17
I.18	Die Wirkung der Dankbarkeit	18
I.19	Die Wirkung der Dankbarkeit	19
I.20	Die Wirkung der Dankbarkeit	20
I.21	Die Wirkung der Dankbarkeit	21
I.22	Die Wirkung der Dankbarkeit	22
I.23	Die Wirkung der Dankbarkeit	23
I.24	Die Wirkung der Dankbarkeit	24
I.25	Die Wirkung der Dankbarkeit	25
I.26	Die Wirkung der Dankbarkeit	26
I.27	Die Wirkung der Dankbarkeit	27
I.28	Die Wirkung der Dankbarkeit	28
I.29	Die Wirkung der Dankbarkeit	29
I.30	Die Wirkung der Dankbarkeit	30
I.31	Die Wirkung der Dankbarkeit	31
I.32	Die Wirkung der Dankbarkeit	32
I.33	Die Wirkung der Dankbarkeit	33
I.34	Die Wirkung der Dankbarkeit	34
I.35	Die Wirkung der Dankbarkeit	35
I.36	Die Wirkung der Dankbarkeit	36
I.37	Die Wirkung der Dankbarkeit	37
I.38	Die Wirkung der Dankbarkeit	38
I.39	Die Wirkung der Dankbarkeit	39
I.40	Die Wirkung der Dankbarkeit	40
I.41	Die Wirkung der Dankbarkeit	41
I.42	Die Wirkung der Dankbarkeit	42
I.43	Die Wirkung der Dankbarkeit	43
I.44	Die Wirkung der Dankbarkeit	44
I.45	Die Wirkung der Dankbarkeit	45
I.46	Die Wirkung der Dankbarkeit	46
I.47	Die Wirkung der Dankbarkeit	47
I.48	Die Wirkung der Dankbarkeit	48
I.49	Die Wirkung der Dankbarkeit	49
I.50	Die Wirkung der Dankbarkeit	50
I.51	Die Wirkung der Dankbarkeit	51
I.52	Die Wirkung der Dankbarkeit	52
I.53	Die Wirkung der Dankbarkeit	53
I.54	Die Wirkung der Dankbarkeit	54
I.55	Die Wirkung der Dankbarkeit	55
I.56	Die Wirkung der Dankbarkeit	56
I.57	Die Wirkung der Dankbarkeit	57
I.58	Die Wirkung der Dankbarkeit	58
I.59	Die Wirkung der Dankbarkeit	59
I.60	Die Wirkung der Dankbarkeit	60
I.61	Die Wirkung der Dankbarkeit	61
I.62	Die Wirkung der Dankbarkeit	62
I.63	Die Wirkung der Dankbarkeit	63
I.64	Die Wirkung der Dankbarkeit	64
I.65	Die Wirkung der Dankbarkeit	65
I.66	Die Wirkung der Dankbarkeit	66
I.67	Die Wirkung der Dankbarkeit	67
I.68	Die Wirkung der Dankbarkeit	68
I.69	Die Wirkung der Dankbarkeit	69
I.70	Die Wirkung der Dankbarkeit	70
I.71	Die Wirkung der Dankbarkeit	71
I.72	Die Wirkung der Dankbarkeit	72
I.73	Die Wirkung der Dankbarkeit	73
I.74	Die Wirkung der Dankbarkeit	74
I.75	Die Wirkung der Dankbarkeit	75
I.76	Die Wirkung der Dankbarkeit	76
I.77	Die Wirkung der Dankbarkeit	77
I.78	Die Wirkung der Dankbarkeit	78
I.79	Die Wirkung der Dankbarkeit	79
I.80	Die Wirkung der Dankbarkeit	80
I.81	Die Wirkung der Dankbarkeit	81
I.82	Die Wirkung der Dankbarkeit	82
I.83	Die Wirkung der Dankbarkeit	83
I.84	Die Wirkung der Dankbarkeit	84
I.85	Die Wirkung der Dankbarkeit	85
I.86	Die Wirkung der Dankbarkeit	86
I.87	Die Wirkung der Dankbarkeit	87
I.88	Die Wirkung der Dankbarkeit	88
I.89	Die Wirkung der Dankbarkeit	89
I.90	Die Wirkung der Dankbarkeit	90
I.91	Die Wirkung der Dankbarkeit	91
I.92	Die Wirkung der Dankbarkeit	92
I.93	Die Wirkung der Dankbarkeit	93
I.94	Die Wirkung der Dankbarkeit	94
I.95	Die Wirkung der Dankbarkeit	95
I.96	Die Wirkung der Dankbarkeit	96
I.97	Die Wirkung der Dankbarkeit	97
I.98	Die Wirkung der Dankbarkeit	98
I.99	Die Wirkung der Dankbarkeit	99
I.100	Die Wirkung der Dankbarkeit	100

In Dankbarkeit

Frau Ilse Zinke
Familie Wellborn

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Historisches zum Konzept der hypothalamischen Neurosekretion	1
1.2	Stand der Forschung	2
1.3	Problemstellung	5
1.4	Topographie des Hypothalamus	6
1.5	Historisches zum axonalen Transport von großmolekularen Proteinen	10
1.5.1	Charakterisierung der Meerrettich-Peroxidase	11
1.5.2	Anwendungsbeispiele der Meerrettich-Peroxidase-Transport-Methode	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Berechnung der stereotaktischen Koordinaten	13
2.3	Vorbereitung der Versuchstiere zur stereotaktischen Injektion	15
2.4	Angewandtes Transportprotein und Injektionsverfahren	16
2.5	Perfusionsfixierung der Versuchstiere	17
2.6	Anfertigung von Gefrier- und Vibratomschnitten	19
2.7	Paraffineinbettung	19
2.8	Anfertigung von Paraffinschnitten (1,5 μm und 7 μm)	19
2.9	Herstellung von Antiseren	20

2.10	Immunhistochemischer Reaktionsablauf zur Darstellung der retrograd transportierten Meerrettich-Peroxidase sowie der endogenen Neuropeptide	22
2.11	Verwandte Chemikalien und Geräte	28
3	<u>ERGEBNISSE</u>	30
	Darstellung von Projektionen nach Injektion von Meerrettich-Peroxidase in Vasopressin enthaltende Terminalgebiete	
3.1	Telencephalon	30
3.2	Diencephalon	33
3.3	Mesencephalon	37
3.4	Pons	40
3.5	Medulla oblongata	42
3.6	Bildteil zu den Ergebnissen	45
4	<u>DISKUSSION</u>	58
4.1	Kritik zur Meerrettich-Peroxidase-Methode	58
4.2	Kritische Betrachtung der mittels Peroxidase dargestellten Projektionen	60
4.2.1	Telencephalon	60
4.2.2	Diencephalon	63
4.2.3	Mesencephalon	67
4.2.4	Pons	70
4.2.5	Medulla oblongata	72
4.3	Faserprojektionen des Nucleus supraopticus	73
4.4	Beiträge zur funktionellen Bedeutung	74
4.5	Bildteil zur Diskussion	77

5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	81
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	83

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN ZU DEN BILDTAFELN

Ac	=	Aquaeductus cerebri
CA	=	Commissura anterior
Cc	=	Canalis centralis
CO	=	Chiasma opticum
MRP	=	Meerrettich-Peroxidase
Ncp	=	Nucleus caudatus putamen
Nrd	=	Nucleus raphes dorsalis
Ndv	=	Nucleus dorsalis vagi
NPH	=	Neurophysin
Npr	=	Nucleus periventricularis rotundocellularis thalami
Nps	=	Nucleus periventricularis stellato-cellularis thalami
Npv	=	Nucleus paraventricularis hypothalami
Nsc	=	Nucleus suprachiasmaticus
Nsl	=	Nucleus septi lateralis
Nts	=	Nucleus tractus solitarii
Pc	=	Plexus choroideus
Sth	=	Stria terminalis pars hypothalamica
TCC	=	Truncus corpus callosi
Tcm	=	Tractus corticohypothalamicus medialis
VP	=	Vasopressin
3.V	=	Ventriculus tertius

1 EINLEITUNG

1.1 Historisches zum Konzept der hypothalamischen Neurosekretion

Die Bedeutung des Hypothalamus als Zentrum für die Steuerung der Hypophyse wurde Anfang der 30er Jahre diskutiert. Die anatomische Beschreibung eines ausgedehnten Kapillarnetzes zwischen dem basalen Hypothalamus und dem Hypophysenvorderlappen wurde von Popa und Fielding (1930 und 1933) veröffentlicht. Sie verglichen dieses Kapillarnetz in seinem Aufbau mit dem Portalsystem der Leber, über das der Hypothalamus einen in der Folgezeit noch zu beweisenden Einfluß auf den Vorderlappen der Hypophyse ausüben soll.

Beobachtungen über sekretorische Vorgänge an Nervenzellen (E. Scharrer 1934 a und b) führten zu einem Konzept, in dem magnocellulären Neuronen des Hypothalamus sekretorische Funktionen zugesprochen wurden (Scharrer und Scharrer 1940).

Die lichtmikroskopische Darstellung dieser postulierten neurosekretorischen Neurone gelang Bargmann (1949) mittels der Chromalaun-Hämatoxylin-Färbung (Gomori 1941). Magnocelluläre Neurone im Hypothalamus (Nucleus paraventricularis und supraopticus) des Hundes konnten in ihrem Verlauf bis an Kapillaren des Hypophysenhinterlappens verfolgt werden. In den darauffolgenden Jahren wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen, daß es sich bei den anfärbbaren Strukturen in der Neurohypophyse um sekretorische Granula handelte (Bargmann und Knoop 1957, Palay 1957, Hartmann 1958).

1942 gelang es van Dyke et al., aus der Neurohypophyse ein Peptid zu isolieren, das einen Einfluß auf das Vegetativum ausübte. Dieses damals nach ihm benannte van Dyke-Peptid zeigte an Versuchstieren nach intravenöser Applikation eine uteruskontrahierende, blutdrucksteigernde und die renale Ausscheidung einschränkende Wirkung.

1954 isolierte Du Vigneaud aus Hypophysenhinterlappenextrakten zwei cyclische Oktapeptide, die sich innerhalb ihrer Sequenz in nur zwei Aminosäuren voneinander unterschieden, nämlich Oxytocin und Vasopressin.

Das Konzept der Neurosekretion, die Aufdeckung der Aminosäuresequenzen von Vasopressin und Oxytocin, sowie die Methode der Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen diese Peptide ermöglichten später die immunhistochemische Darstellung (Sternberger et al. 1970) von Vasopressin- und Oxytocin-bildenden Neuronen des Nucleus paraventricularis und des Nucleus supraopticus (Zimmermann et al. 1973 a, Vandesande und Dierickx 1975).

1.2 Stand der Forschung

Die beiden größten Neuronengruppen, die Vasopressin, Oxytocin sowie Neurophysin, ein Begleitpeptid dieser beiden Oktapeptide, enthalten, liegen im Nucleus paraventricularis und im Nucleus supraopticus des Hypothalamus. Sogenannte akzessorische, magnocelluläre Vasopressin- und Oxytocin-bildende Neurone finden sich, in kleinen Gruppen angeordnet, im Hypothalamus verteilt (Peterson 1966, Sawchenko und Swanson 1982, Swanson und Sawchenko 1983).

Eine dieser Untergruppen liegt im dorsalen Teil des vorderen Hypothalamus, im Umfeld der Stria terminalis, eine weitere Gruppe (ebenfalls im vorderen Hypothalamus) läßt sich in der Zona internuclearis zwischen dem Nucleus supraopticus und dem Nucleus paraventricularis beschreiben, eine dritte Gruppe im vorderen Hypothalamus und zwei weitere in Fornixnähe.

Parvocelluläre Neurone, die Vasopressin bilden, wurden im Nucleus suprachiasmaticus (s.S. 8) gefunden, ferner in weiteren Kerngebieten außerhalb des Hypothalamus. Die Darstellung dieser Neurone gelang van Leeuwen und Caffé (1982) sowie

Caffé und van Leeuwen (1983) erst nach intraventrikulärer Injektion von Colchizin. Diese vasopressinergen Zellen wurden beschrieben im Nucleus interstitialis der Stria terminalis, in der medialen Amygdala, im Nucleus dorsomedialis hypothalami sowie im Locus coeruleus. Eine andere Möglichkeit Vasopressin- und Oxytocin-bildende Neuronengruppen zu unterteilen wurde von Armstrong und Hatton 1980, von Swanson und Kuypers 1980 und von Koh und Ricardo 1980 im Hinblick auf deren efferente Projektionen unternommen.

Der rostrale und laterale Teil des Nucleus paraventricularis gibt Projektionen zur Zona externa der Eminentia mediana und zu den Portalkapillaren der Hypophyse ab (Stillman et al. 1977). Der mediale Anteil zieht vorwiegend zum Hypophysenhinterlappen, während aus dem hinteren Anteil nur sehr wenige Neurone an den Kapillaren des Hinterlappens enden (Swanson und Sawchenko 1980 und 1983). Die oben erwähnten Vasopressin enthaltenden Neuronengruppen, die sich sowohl im vorderen als auch im hinteren Hypothalamus im Umfeld des Nucleus paraventricularis befinden, ziehen zum Hypophysenhinterlappen und haben damit Anschluß an den großen Blutkreislauf.

Zum Nachweis von neuronalen Projektionen wurden zwei Wege beschritten: Läsionsexperimente und Tracerstudien. Nach gezielter Zerstörung von Neuronengruppen wurde im Vergleich mit unbehandelten Tieren gezeigt, daß die Fasern und Terminalen an der Eminentia mediana abgenommen hatten (Antunes et al. 1977). So konnte geschlossen werden, daß zwischen dem Nucleus paraventricularis und der Eminentia mediana eine direkte Verbindung besteht.

Zimmerman et al. (1973 b) hatten eine Hypothese aufgestellt, nach der Vasopressin der vom Nucleus paraventricularis zur Eminentia mediana verlaufenden Neurone eine Corticotropin-Releasing-Factor-Aktivität besitzt. Indirekte Beweise für

diese Hypothese wurden in den darauffolgenden Jahren erbracht (Zimmerman et al. 1977, Stillman et al. 1977, Dornhorst et al. 1978 und Sofroniew 1982).

Erst nach Isolierung des Corticotropin-Releasing-Factors (Vale et al. 1981) konnten Bugnon et al. (1982) zeigen, daß das neu entdeckte Corticotropin-Releasing-Hormone in demselben Kerngebiet lokalisiert ist wie die Vasopressin enthaltenden Neurone und daß Corticotropin-Releasing-Factor-Neurone ebenfalls über die Zona externa der Eminentia mediana Anschluß an den hypophysären Portalkreislauf haben.

Ein weiteres Verfahren, Faserverbindungen nachzuweisen, besteht darin, als Tracer Meerrettich-Peroxidase in außerhalb des Hypothalamus gelegene Kerngebiete zu injizieren, an denen peptiderge, z.B. vasopressinerge und oxytocinerge Terminalen beschrieben sind und mit einem histochemischen bzw. immunhistochemischen Verfahren den retrograden Transport bis in die Perikaryen der Neurone zu verfolgen.

1.3 Problemstellung

In den Jahren 1978 bis 1982 veröffentlichte die Arbeitsgruppe Weindl/Sofroniew Arbeiten über extrahypothalamische Projektionen des Vasopressin und Oxytocin enthaltenden Nucleus paraventricularis hypothalami (Übersicht siehe Weindl und Sofroniew 1980). In Abgrenzung zum klassischen hypothalamo-neurohypophysären System wurden Faserverläufe beschrieben, die Vasopressin und Oxytocin zu extrahypothalamischen Gebieten wie das Septum, die Amygdala, das zentrale Grau, den Hirnstamm und das Rückenmark transportieren und axo-somatische Kontakte bilden. Ein zusätzliches Kerngebiet, in dem sich immunhistochemisch Neurophysin (im besonderen Vasopressin, jedoch nicht Oxytocin) darstellen ließ, ist ein kleines paariges Kerngebiet im vorderen basalen Hypothalamus, der Nucleus suprachiasmaticus. Eine Verbindung von diesem

zur Neurohypophyse konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Arbeitsgruppe Weindl/Sofroniew stellte sich unter anderem zur Aufgabe, die vasopressinergen Faserverläufe des Nucleus suprachiasmaticus von denen des Nucleus paraventricularis abzugrenzen. Da sich im vorderen Hypothalamus die Faserzüge der beiden Kerngebiete überschneiden, mußten Kriterien gefunden werden, nach denen sich die Fasern dem jeweiligen Kerngebiet zuordnen lassen. Die Unterscheidungskriterien (Sofroniew und Weindl 1978 a und b) wurden derart gewählt, daß dem Nucleus suprachiasmaticus feinkalibrige Vasopressin- und Neurophysin-Fasern und dem Nucleus paraventricularis ausschließlich großkalibrige Fasern zugeordnet wurden. Nach diesen Kriterien wurden Verbindungen vom Nucleus suprachiasmaticus zum lateralen Septum, zum Kerngebiet des diagonalen Bandes von Broca, zu der lateralen Habenula, zum Hypothalamus posterior, zum Nucleus interpeduncularis, zu Teilen des zentralen Graus und zum Nucleus tractus solitarii beschrieben.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß nach Injektion von Meerrettich-Peroxidase in das unter anderem Vasopressin enthaltende Terminalgebiet des Nucleus tractus solitarii sich sowohl magnocelluläre als auch parvocelluläre Neurone im Nucleus paraventricularis mittels eines Antikörpers gegen Meerrettich-Peroxidase immunhistochemisch darstellen ließen. Weiter konnte gezeigt werden, daß ausschließlich die parvocellulären, Meerrettich-Peroxidase-markierten Zellen Neurophysin (Vasopressin oder Oxytocin) enthielten (Sofroniew und Schrell 1981 und 1982).

Dieser Nachweis, daß ausschließlich parvocelluläre Neurone Vasopressin und Oxytocin in kleinkalibrigen Fasern vom Nucleus paraventricularis zum Hirnstamm transportieren, legte nahe, das oben beschriebene Unterscheidungskriterium und damit die vasopressinergen Projektionen des Nucleus suprachiasmaticus zu überprüfen.

Im Frühjahr 1979 bekam ich als Doktorand die Aufgabe, die extrahypothalamischen vasopressinergen Projektionen mittels des retrograden Transportes von Meerrettich-Peroxidase darzustellen.

1.4 Topographie des Hypothalamus

Der Hypothalamus liegt ventral vom Thalamus, ist paarig aufgebaut und liegt beidseits des dritten Ventrikels, dessen Wände und Boden er bildet. Nach rostral zu wird er von der Commissura anterior, dem diagonalen Band von Broca und der Lamina terminalis, einer dünnen Gewebsschicht, die aus Kapillaren, Neuronen und Glia besteht, begrenzt. Nach ventral zu liegt der Hypothalamus der mittleren Schädelgrube an. Caudal vom Chiasma opticum läuft der Boden des dritten Ventrikels mit der Eminentia mediana in das Infundibulum aus. In lateraler Richtung begrenzen die Stammganglien, in caudaler Richtung die Substantia nigra und das mesencephale Tegmentum den Hypothalamus (Bleier et al. 1977).

Zur Beschreibung der hypothalamischen Kerngebiete hat es sich bewährt, den Hypothalamus in drei Regionen einzuteilen:

- a) die Regio hypothalamica anterior
- b) die Regio hypothalamica intermedia
- c) die Regio hypothalamica posterior

1.4.1 Regio hypothalamica anterior

Die Regio hypothalamica anterior wird rostral vom diagonalen Band von Broca, caudal vom Tuber cinereum und lateral von der lateralen hypothalamischen Region begrenzt.

Die mediale präoptische Region besteht aus einer Ansammlung von verschiedenen großen und in ihrer Dichte unterschiedlichen Zellgruppen.

Beschreibt man die Kerngebiete von rostral nach caudal, so sind aufzuzählen: die Zellgruppe des Organum Vasculosum der Lamina terminalis, die Nuclei praeoptici lateralis und medialis, der Nucleus suprachiasmaticus, der weiter unten (s.S. 8) ausführlicher behandelt wird; der Nucleus hypothalamicus anterior, der aus verstreut liegenden Zellgruppen besteht und nach dorsolateral zu vom Nucleus interstitialis der Stria terminalis begrenzt wird; der Nucleus supraopticus, der aus magnocellulären Neuronen besteht und dessen größter Anteil in rostraler Richtung unmittelbar vor dem Chiasma opticum liegt, während der kleinere Anteil caudal vom Chiasma und medial des Tractus opticus gelegen ist; als letztes Kerngebiet ist der Nucleus paraventricularis zu nennen, der im caudalen Anteil der Regio hypothalamica anterior beginnt und sich über die Regio hypothalamica intermedia bis zur Regio hypothalamica posterior erstreckt.

1.4.2 Regio hypothalamica intermedia

In diesem Gebiet liegt der Hauptanteil des Nucleus paraventricularis hypothalami. Dieses Kerngebiet besteht in seinen rostralen und medialen Anteilen überwiegend aus magnocellulären Neuronen. Im medialen Anteil liegen die größten hypothalamischen Neurone (20 - 25 μm), nach caudal zu besteht das Kerngebiet aus vorwiegend parvocellulären Neuronen (10 - 15 μm) (Van den Pol 1982).

Die Kerngebiete der Regio hypothalamica intermedia werden wieder in rostro-caudaler Richtung aufgelistet: der Nucleus ventromedialis hypothalami, der sich unterteilen läßt in einen dichten dorsomedialen und ventromedialen und einen aufgelockerten zentralen Teil; der Nucleus arcuatus (Nucleus infundibularis), der den ventralen Anteil des dritten Ventrikels umfaßt und sich bis in die Regio hypothalamica posterior erstreckt; der Nucleus dorsomedialis hypothalami, der medial und dorsal des Nucleus ventromedialis liegt und ebenfalls in

die Regio hypothalamica posterior übergeht.

1.4.3 Regio hypothalamica posterior

Die Regio hypothalamica posterior wird medial begrenzt vom dritten Ventrikel, lateral vom Tractus mamillothalamicus sowie den Forel'schen Feldern und caudal vom Recessus infammillaris. Den überwiegenden Teil dieses hypothalamischen Gebietes nehmen die Corpora mamillaria ein; sie werden in je eine mediane, mediale, laterale und posteriore Gruppe unterteilt. Die Mamillarkörper stehen über den Fornix in enger Beziehung zum Limbischen System. Abschließend sind noch zu erwähnen das supramamilläre Kerngebiet, das in der Decussatio supramamillaris liegt, sowie der Nucleus tubero-mamillaris, der sich in rostrocaudaler und mediolateraler Richtung im lateralen Hypothalamus erstreckt.

Ausführliche Literaturhinweise zur Cytoarchitektur des Hypothalamus finden sich bei Gurdjian (1927), Krieg (1932), Knigge und Silverman (1974) und Bleier et al. (1977).

1.4.4 Nucleus suprachiasmaticus

1975 zeigten Vandesande et al. Vasopressin- (Neurophysin-) produzierende Neurone im Nucleus suprachiasmaticus der Ratte. Die Fasern des Nucleus suprachiasmaticus verfolgend, postulierten sie eine Verbindung zu den Portalkapillaren der Zona externa der Eminentia mediana. In einer späteren Untersuchung von Vandesande et al. (1977) konnte diese Annahme nicht bestätigt werden. Schon hier zeichnet sich die Schwierigkeit, den Faserverlauf des Nucleus suprachiasmaticus von dem des Nucleus paraventricularis zu trennen, ab.

Der Nucleus suprachiasmaticus ist ein kleines ovoides Kerngebiet, das im vorderen Hypothalamus über dem Chiasma opticum zu beiden Seiten des dritten Ventrikels liegt

(Diepen 1962, Christ 1969). Der Nucleus suprachiasmaticus läßt sich bei niederen Vertebraten sowie bei Säugern, auch Primaten einschließlich dem Menschen, nachweisen (Crosby und Showers 1969, Sofroniew und Weindl 1980, Sofroniew et al. 1981).

Der Nucleus suprachiasmaticus wird über eine retinale Faserverbindung als ein Schaltzentrum zwischen visueller Außenwelt und Hypothalamus angesehen (Hendrickson et al. 1972, Moore und Lenn 1972, Moore 1973, Nishino et al. 1976, Mai und Junger 1977). Über diesen Weg soll der Nucleus suprachiasmaticus circadiane Rhythmen wie Trinkverhalten (Stephan und Zucker 1972), den Cortisol-Tagesrhythmus (Moore und Eichler 1972) und den Wach-Schlafrhythmus (Ibuka und Kawamura 1975) steuern.

Von der Retina kommende Fasern enden im ventralen, lateralen und caudalen Teil des Nucleus suprachiasmaticus. (Bunt et al. 1976, Mai und Junger 1977).

Fuxe (1965) wies nach, daß an diesen Anteilen des suprachiasmatischen Kerngebietes serotonerge Axone des Raphe-Komplexes enden. Die Vasopressin enthaltenden Neurone scheinen weder von der Retina her noch mittels Serotonin beeinflußt zu werden (Mai und Junger 1977, Steinbusch 1981). Sie liegen hauptsächlich im dorsalen, medialen und rostralen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus.

Es wäre verfrüht, anzunehmen, daß die Vasopressin enthaltenden Neurone des Nucleus suprachiasmaticus am circadianen Rhythmus beteiligt sind.

1.5 Historisches zum axonalen Transport von großmolekularen Proteinen

Morax und Marie (1903) entwickelten eine These über die Pathogenese des Tetanus. Sie vermuteten, daß das Toxin über Fortsätze von Nervenzellen aufgenommen wird, zum zentralen

Nervensystem transportiert wird und dort eine toxische Wirkung ausübt.

Goodpasture (1925) schloß sich dieser Hypothese der retrograden Aufnahme von Krankheitserregern an und postulierte einen ähnlichen Mechanismus für das Herpes simplex-Virus.

Weisz und Hiscoe (1948) haben einen anterograden Transport in Axonen gezeigt. Das Postulat eines anterograden als auch retrograden Transportes wurde später experimentell belegt (Johnson und Mims 1968).

Diese Beobachtung wurde dahingehend genutzt, daß man nach Stoffen suchte, die über den axonalen Transport zum Zellkörper hin aufgenommen werden und diesen zur Darstellung bringen können. Einer dieser Stoffe war an Serumalbumin gekoppeltes Evansblue, das im ultravioletten Licht rot fluoreszierte (Steinwall und Klatzo 1966, Kristensson 1970, Kristensson und Olsson 1971).

Ein zweiter, sich in der Folgezeit als äußerst nützlich erweisender Transportstoff war Meerrettich-Peroxidase. Graham und Karnovsky (1966) gelang es, die sich intracellulär akkumulierende Meerrettich-Peroxidase mittels eines enzymhistochemischen Verfahrens sichtbar zu machen und somit die Zelle morphologisch darzustellen. Sie wiesen an der Niere der Maus elektronenmikroskopisch die Aufnahme von Meerrettich-Peroxidase in den Vesikeln der Zelle nach.

Kristensson und Olsson (1971) wendeten dieses Verfahren zur Darstellung im zentralen Nervensystem an. Sie injizierten Meerrettich-Peroxidase in die Zunge von Ratten und wiesen sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch Meerrettich-Peroxidase in den Perikaryen des Nucleus hypoglossus des Hirnstammes nach.

Kuypers et al. (1974) zeigten erstmals retrograd markierte Faserzüge innerhalb des zentralen Nervensystems. Sie injizierten Meerrettich-Peroxidase in das Frontalhirn der

Ratte und wiesen histochemisch im Umfeld ihrer Injektionsstelle markierte Neurone nach.

1.6 Charakterisierung der Meerrettich-Peroxidase

Die Meerrettich-Peroxidase ist ein Glyko-Protein mit einem Molekulargewicht von 42 000 Dalton, das eine enzymatische, zur Katalyse fähige Gruppe enthält. Mittels des Substrates Wasserstoffperoxid lassen sich verschiedene Stoffe, z.B. 3,3'-Diaminobenzidin, oxidieren und zu einem dichten, lichtabsorbierenden Komplex verbinden (Straus 1974, Rennke und Venkatachalam 1979). Die Aufnahme der Meerrettich-Peroxidase-Moleküle wird als endocytotischer Vorgang verstanden (Schwartz 1979).

1.7 Anwendungsbeispiele der Meerrettich-Peroxidase-Transport-Methode

Die Meerrettich-Peroxidase-Methode hat im Laufe der letzten Jahre drei wesentliche Anwendungsbereiche gefunden:

1. Nachweis von efferenten Projektionen im Zentralnervensystem von Versuchstieren. Diese Anwendung geht davon aus, daß die Meerrettich-Peroxidase von Zellkörpern innerhalb des Injektionsgebietes aufgenommen wird und *a n t e r o - g r a d* über das Axon zu den Axonterminalen transportiert wird.

2. Darstellung von Nervenzellen einschließlich ihrer Dendriten und Axone nach intracellulärer Applikation von Meerrettich-Peroxidase. Verglichen mit der Golgi-Methode kann eine ähnliche differenzierte morphologische Beschreibung der dargestellten Neurone vorgenommen werden (Hedreen und McGrath 1977, Keefer 1978, Vanegas et al. 1978).

3. Nachweis von afferenten Projektionen. Hierzu wird die Meerrettich-Peroxidase in bestimmte Regionen des Zentralnervensystems injiziert, wo sie von Terminalen aufgenommen

und r e t r o g r a d über Axone und in die Somata transportiert wird. Da sich die Meerrettich-Peroxidase über eine enzymatische Reaktion (s.S. 27) lichtmikroskopisch darstellen läßt, kann das Neuron in seinem Verlauf sichtbar gemacht und damit Aufschluß über Faserprojektionen gewonnen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die hier vorgelegten Ergebnisse wurden an 75 Ratten beiderlei Geschlechts (Zuchtstamm: Sprague Dawley) ermittelt. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur und jahreszeitlich wechselndem Hell-Dunkelrhythmus in Acrylkäfigen gehalten. Wasser und Futter (Altromin Pellets) standen ad libitum zur Verfügung.

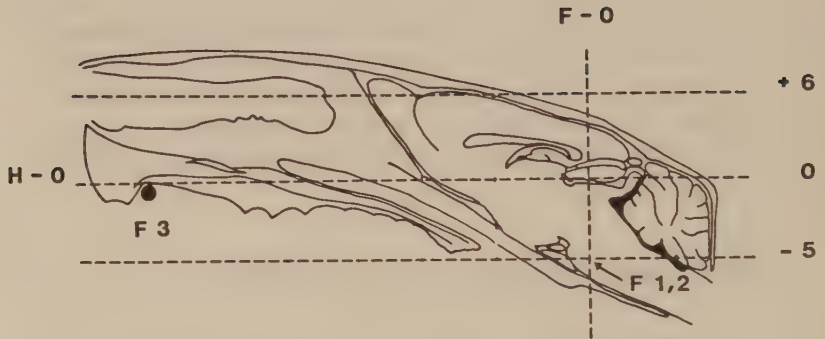
2.2 Berechnung der stereotaktischen Koordinaten

Die Koordinatenberechnung erfolgte nach dem Atlas von Pellegrino et al. (1967). Das Gewicht der Ratten, an dem der Atlas standardisiert ist, variiert zwischen 280 und 300 Gramm. Dieser Gewichtsklasse entsprechen ca. einjährige, geschlechtsreife Ratten.

Ausgeführt wurden die Injektionen an einem stereotaktischen Gerät von David Kopf Instruments unter Verwendung eines Mikromanipulators (s.S. 29).

Die Einstellung des Rattenkopfes im Stereotaxiegerät erfolgte gemäß der Anweisung von Pellegrino et al. (1967).

DEFINITION DER NULLEBENE



Der Kopf der Ratte wurde an drei Punkten fixiert. Die ersten beiden Fixpunkte (F 1,2) sind die äußeren Gehörgänge des Tieres; in jeden wird ein Ohrstab eingeführt, dessen anderes Ende wird im stereotaktischen Gerät fest eingespannt. Der dritte Fixpunkt (F 3) liegt hinter den beiden oberen Schneidezähnen; der Oberkiefer wird unverrückbar in einer Öse befestigt.

Würden die Punkte (F 1,2 und F 3) in einer Ebene liegen, so würde die Intraauralebene (Ebene durch F 1,2) mit der Nullebene (H - 0) zusammenfallen. Durch Anheben des Punktes (F 3) um 5,0 mm wird der Schädel um 10^0 aufgerichtet. Eine Ebene parallel zur Intraauralebene durch den Punkt (F 3) wird zur horizontalen Nullebene (H - 0) definiert. Senkrecht zu dieser Nullebene (H - 0) wird durch die Punkte (F 1,2) eine frontale Ebene (F - 0) errichtet. Die Schnittbilder stellen Parallelebenen zu dieser Nullebene (F - 0) dar.

2.3 Vorbereitung der Versuchstiere zur stereotaktischen Injektion

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die Tiere mit Nembutal (Phenobarbital), 3,5 mg/100 g Körpergewicht, intraperitoneal, narkotisiert. Da wir aufgrund der geringen Steuerbarkeit dieses Narkotikums mehrere Tiere verloren, suchten wir nach einem besser steuerbaren Betäubungsmittel. Bewährt hat sich in weiteren Versuchen Brevimylal-Na (s.S. 28) in einer Dosierung von 0,5 ml/100 g Körpergewicht, ebenfalls intraperitoneal appliziert.

Um das Einführen des Ohrstabes in den äußeren Gehörgang zu erleichtern, wurde durch eine kleine Inzision am unteren Ohrmuschelrand der äußere Gehörgang erweitert. Die Ohrstäbe wurden unter sanftem Druck vorgeschoben, bis sie sicher im äußeren Gehörgang festsaßen. Die Ohrstäbe wurden im Gerät fixiert, die vorderen Schneidezähne in die Öse eingehakt und der oben beschriebene Winkel von 10^0 eingestellt.

Nach Rasur des Schädels erfolgte eine Inzision der Kopfhaut über der Sagittalnaht. Die Kopfhaut wurde abpräpariert und der Schädel mit seiner Sagittal- und Coronarnaht dargestellt. In Abhängigkeit von der Injektionsstelle wurde die Durchtrittsstelle der Kalotte markiert. Mit einem Kugelpfbohrer (2 mm Ø) wurde die markierte Stelle eröffnet. Es wurde darauf geachtet, daß nach Abschluß des Bohrvorganges die Dura noch intakt war. Mit einer feinen langgeschliffenen Kanüle wurde die Dura geschlitzt, ohne das Gehirn zu verletzen. Durch diesen Zugang erfolgte entsprechend den berechneten Koordinaten die Injektion.

Um die Kerngebiete des Hirnstammes zu erreichen, wurde ein anderer Zugang als der oben beschriebene angewandt. Nach Betäubung und Fixierung der Ratte im Stereotaxiegerät wurde das Fell im Bereich des okzipitalen Überganges rasiert, die desinfizierte Haut mit einem Skalpell in der Mittellinie durchschnitten, die Nackenmuskulatur von medial nach lateral

abpräpariert und die atlanto-okzipitale Membran dargestellt. Nach deren medianer Durchtrennung und Absaugen von Liquor kamen die dorsalen Strukturen des Hirnstammes zur Darstellung. Die Injektionen von Meerrettich-Peroxidase erfolgten entsprechend den stereotaktischen Koordinaten nach Pellegrino et al. (1967) sowie auch unter Sichtkontrolle der Oberflächenstrukturen des dorsalen Hirnstammes.

2.4 Angewandtes Transportprotein und Injektionsverfahren

Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Typ VI; s.S. 28) wurde in 0,06 molarem Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Im Laufe der Versuchsreihe hat es sich bewährt, dem Phosphatpuffer ein Detergens (Nonidet-40, Sigma) in einer Konzentration von 5% zuzusetzen (s.S. 28).

Um eine sichere Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden drei Injektionsverfahren mit abnehmender Menge und Konzentration an Meerrettich-Peroxidase angewandt.

1. Für große Injektionen wurde eine 1 µl Hamilton-Spritze mit einem Nadeldurchmesser von 0,5 mm benutzt, und 30%ige Meerrettich-Peroxidase in Mengen zwischen 0,05 und 0,15 µl injiziert. Diese Übersichtsinjektionen waren vor allem bei den negativen Ergebnissen (d.h. in den Fällen, in denen keine Anfärbung des Nucleus suprachiasmaticus gefunden werden konnte) zur Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung. Zudem konnten mit diesen Injektionen vereinzelt markierte Zellen morphologisch beschrieben werden, da eine ausreichende Menge von Meerrettich-Peroxidase im Zellsoma akkumuliert war. Über eine Mikrometerschraube wurde der Spritzenkolben in kleinen Schritten abgesenkt, so daß die Injektion 20 bis 30 Minuten in Anspruch nahm.

2. In einem zweiten Injektionsverfahren wurden selbstgezogene Glaskapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 80 bis 120 µm benutzt. Die Kapillaren wurden über eine Nadel

mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze verbunden. Durch dieses Verfahren war es möglich, kleinere Injektionsstellen und damit einen kleineren Diffusionshof (bei geringerer Zerstörung von Nervengewebe) zu erreichen. Die injizierten Mengen betrugen gegenüber dem ersten Injektionsverfahren nur noch ein Zehntel des Volumens. Der Injektionsablauf erfolgte wie oben. Nützlich erwies sich dieses Verfahren bei solchen Injektionsstellen, die in der Übersichtsinjektion eine gesicherte Markierung des Nucleus suprachiasmaticus erbracht hatten. Die geringere Zerstörung von Gewebe und die um den Faktor 10 kleinere Injektionsmenge ließen eine genaue Lokalisation und somit eine ausreichende Interpretation zu.

3. Als dritte Möglichkeit stand uns die iontophoretische Applikation von Meerrettich-Peroxidase zur Verfügung. Es wurden selbstgezogene Glaskapillaren mit einem Spitzendurchmesser von ca. 50 μm benutzt. Es war notwendig, die Konzentration der Meerrettich-Peroxidase auf 10% zu senken, um ein zwangloses Füllen der Glaskapillaren zu gewährleisten. Gelöst wurde die Meerrettich-Peroxidase in einem 0,01 molaren Phosphatpuffer (pH 7,4). Angelegt wurde ein positiver Gleichstrom mit 2 μA , der in Intervallen von jeweils sieben Sekunden an- und ausgeschaltet wurde. Die Applikation erfolgte ebenfalls in einem Zeitraum von 20 bis 30 Minuten. Der Vorzug der iontophoretischen Applikation ist ähnlich wie unter Punkt 2 beschrieben.

Nach Entfernen der Injektionskanüle wurde die Kopfhaut genäht oder geklammert. Die Tiere erwachten bald aus ihrer Narkose und wurden für die nächsten 48 Stunden ohne Einschränkung von Wasser und Futter in Acrylkäfigen gehalten.

2.5 Perfusionsfixierung der Versuchstiere

Herstellung der Fixierungslösung (Bouinsche Lösung)

Die Bouinsche Lösung (s.S. 28) besteht aus einer wässrigen,

gesättigten Lösung von Pikrinsäure, aus gesättigter Formaldehydlösung (37%) sowie aus Eisessig im Mischungsverhältnis 15:5:1. Kurz vor Beginn der Fixierung wurden Pikrinsäure und Formaldehyd durch einen Milliporefilter (Porengröße 0,22 μ m) filtriert und in einem Gefäß zusammengebracht. Der Eisessig wurde erst unmittelbar vor Perfusionsbeginn hinzugefügt. Eine Variante, die erst gegen Ende der Versuchsserie verwandt wurde, bestand darin, daß dem Bouinschen Gemisch noch Quecksilberchlorid beigelegt wurde, und zwar in einem Mischungsverhältnis: Pikrinsäure : Formaldehyd : Sublimat : Eisessig wie 15:5:2:1. Romeis (1968) beschreibt Sublimat als ein ausgezeichnetes Fixans für Proteine. Vandesande und Dierickx (1975) wandten ein Sublimatgemisch ebenfalls erfolgreich zur immunhistochemischen Darstellung neurosekretorischer Neurone bei Ratten an.

Fixierungsvorgang

48 Stunden nach erfolgreicher Injektion wurden die Versuchstiere mit der doppelten Menge an Narkotikum wie es zum operativen Eingriff gegeben wurde, betäubt. Die Tiere wurden laparotomiert, das Zwerchfell eröffnet und das Sternum vom Rippenbogen abgetrennt. In den freiliegenden linken Ventrikel wurden 0,5 ml Liquemin (Heparin 2500 E/ml) injiziert, um möglichst eine Thrombosierung der Kapillaren zu verhindern. Sodann wurde eine Knopfkanüle, die über ein Infusionssystem mit Ringerlösung gefüllt war, durch den linken Ventrikel in die Aorta ascendens vorgeschoben und dort mit einer Klemme befestigt. Der rechte Vorhof wurde eröffnet. Das Kreislaufsystem der Ratte wurde solange gespült, bis die Ringerlösung klar aus dem rechten Vorhof zurückströmte. Unter strenger Beachtung, daß sich keine Luftblasen im Perfusionssystem befanden, wurde das Fixans perfundiert. Eine erfolgreiche Perfusion zeigte sich daran, daß schon kurz nach Einlaufen des Fixans sich die Skleren des Tieres aufgrund des Pikrinsäureanteils gelblich verfärbten. Die Tiere wurden

10 bis 15 Minuten lang perfusionsfixiert, anschließend wurde das Gehirn freipräpariert (wobei die tastbare Konsistenz einen weiteren Hinweis auf die Fixierungsgüte gab) und über Nacht, gelegentlich auch länger, bei 4° C im Fixans aufbewahrt.

2.6 Anfertigung von Gefrier- und Vibratomschnitten

In einem Kryostaten (Linde; s.S. 29) wurden von dem nachfixierten Gehirn bei -18° C 120 µm dicke Schnitte in horizontaler, sagittaler und vorwiegend frontaler Schnittebene angefertigt. Zu einem späteren Zeitpunkt der Versuchsreihe wurde ein Vibratom (Oxford; s.S. 29) benutzt, um Gefrierartefakte auszuschalten. Die Schnitte wurden in Trisphosphatpuffer (pH 7,4) gesammelt und für die nachfolgende immunhistochemische Reaktion sorgfältig ausgewaschen. Das Ausblassen der Schnitte diente als Indikator für die Entfernung des Fixans.

2.7 Paraffineinbettung

Für die Einbettung von Gehirnen in Paraffin (Romeis 1968) erfolgte die Entwässerung in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen bis hin zum absoluten Alkohol. Über Methylbenzoat gelangten die Gehirne in Paraffin (Paraplast-Plus s.S. 29) bei 56° C im Brutschrank. Nach ausreichender Durchtränkung mit Paraffin wurden die Objekte auf transversale Blöcke von 10x5x5 mm zugeschnitten und in Paraffin eingebettet.

2.8 Anfertigung von Paraffinschnitten (1,5 µm und 7 µm)

Mittels des Auto-Cut (Modell 1140 Jung; s.S. 29) wurden 1,5 µm dicke Paraffinschnitte mit einem Glasmesser, wie es für die Ultramikrotomie verwandt wird, angefertigt. Diese

Schnitte stellen das Ausgangsmaterial für die vergleichende immunhistochemische Darstellung der Einzelneurone dar (Schrell und Sofroniew 1982).

Ferner wurden 7 μ m dicke Schnitte auf übliche Weise hergestellt.

2.9 Herstellung von Antiseren

Ziel war es, Antikörper in ausreichender Menge und von hoher Spezifität zu gewinnen.

Als Antigene standen zur Verfügung die Neuropeptide Vasopressin, Oxytocin, das Begleitpeptid Neurophysin und Meerrettich-Peroxidase als Transportprotein.

Die Oktapeptide Vasopressin und Oxytocin standen als synthetische Peptide von hohem Reinheitsgrad und hoher biologischer Aktivität (Geschenk der Firma Ferring, Kiel) zur Verfügung. Da kleine Proteine in ihrer nativen Form zur Immunisierung keine ausreichende Antigenität besitzen, wurden sie nach dem Verfahren von Skowsky und Fisher (1972) an Thyroglobulin gekoppelt.

Das aus Schweinehypophysen extrahierte Neurophysin (Geschenk der Firma Ferring, Malmö) bedurfte aufgrund seiner molekularen Größe von 10 000 Dalton keines weiteren Kopplungsvorganges.

Das gleiche gilt für das Transportprotein Meerrettich-Peroxidase mit einem Molekulargewicht von 42 000 Dalton.

Die an Thyroglobulin gekoppelten Oktapeptide (Vasopressin und Oxytocin), das Neurophysin und die Meerrettich-Peroxidase wurden in Mengen zu je 0,2 ml portioniert und bei -30° C eingefroren. Unmittelbar vor dem Immunisierungsvorgang wurden die jeweiligen Portionen mit gleichen Volumenteilen komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt. Diese Emulsion stellte das

Ausgangsmaterial zur Immunisierung dar.

Immunisierung und Boosterung

Vor der ersten Immunisierung wurde der Rücken der Kaninchen in einer Länge von 25 cm und einer Breite von 15 cm sorgfältig geschoren und die Haut mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Das emulgierte Immunisierungsgemisch (0,4 ml) wurde streng intracutan, verteilt auf 60 bis 80 kleinste Injektionen, appliziert (Vaitukaitis et al. 1971, Sofroniew et al. 1978). Erneut immunisiert (Boosterung) wurden die Kaninchen in Abständen von jeweils 2 Wochen. Nach der dritten Boosterung wurde erstmals Blut zur Austestung des Antikörpertiters abgenommen und die Immunisierung für zwei Monate unterbrochen. Nach dieser Pause erfolgten weitere vierzehntägige Boosterungen und Blutabnahmen alle 3 Wochen.

Vor Abnahme des Blutes wurden die Randvenen der Kaninchenohren mit Xylol hyperämisiert. Die Spritze wurde mit wenigen Tropfen Heparin benetzt und Blutmengen von 3 x 20 ml entnommen. Anschließend wurde das Blut bei + 4⁰ C und 3000 UpM zentrifugiert, der Überstand (Plasma) portioniert und bei - 30⁰ C eingefroren. Ein Teil wurde später lyophilisiert.

Spezifitätsnachweis der Antikörper

Die Spezifität der Antikörper gegen Vasopressin und Oxytocin wurden in einem Radio-Immuno-Assay getestet. Die Antikörper gegen Vasopressin konnten in einer Verdünnung von 1:400 000 und die Antikörper gegen Oxytocin in einer Verdünnung von 1:30 000 eingesetzt werden. Bei diesen Verdünnungen bindet ein spezifischer Antikörper das mit radioaktivem Jod markierte Antigen noch zu 50%. Eine Kreuzreaktion zwischen beiden Antikörpern konnte ebenfalls im RIA ausgeschlossen und damit die hohe Spezifität belegt werden.

2.10 Immunhistochemischer Reaktionsablauf zur Darstellung der retrograd transportierten Meerrettich-Peroxidase sowie der endogenen Neuropeptide

Waschlösung

Zum Auswaschen des Fixans sowie zum Waschen zwischen den einzelnen immunhistochemischen Verfahrensschritten wurde Trisphosphatpuffer (0,1 mol) benutzt. In einem Liter Aqua dest. oder deionisiertem Wasser wurden 5 g Tris (Hydroxymethylaminomethan), 1,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,43 g $\text{K H}_2\text{PO}_4$, 0,7 g NaCl und als Konservierungszusatz 0,2 g NaN_3 gelöst (s.S. 28).

Basislösung für die Antikörper

In den oben beschriebenen Phosphatpuffer wurde Lambda-Carrageenan (Sigma) eingewogen (0,5%ig). Carrageenan ist ein pflanzliches Eiweiß aus Seetang, durch dessen Zusatz der unspezifische Hintergrund bei der enzymatischen Reaktion mit Diaminobenzidin deutlich gesenkt werden konnte. Außerdem wurden 0,7% Triton X-100 hinzugefügt. Dieses Detergens macht Zellmembranen durchlässig und ermöglicht dadurch eine leichtere Diffusion der Antikörper. Es konnte durch diesen Zusatz, ohne daß sich im lichtmikroskopischen Bereich Artefakte zeigten, eine deutlich bessere Darstellung der Neurone erzielt werden.

Inkubationslösung („1. Antiserum“)

Die zuletzt beschriebene Lösung (Phosphatpuffer, Carrageenan und Triton-X-100-Gemisch) stellt das Lösungsmittel für alle Antikörper dar. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:400 benutzt. Die genaue Einstellung innerhalb dieser Verdünnungsspanne wurde empirisch in Ab-

hängigkeit von der Darstellbarkeit der Neurone und der unspezifischen Hintergrundanfärbung gewählt.

Es ergaben sich folgende Verdünnungen: Neurophysin 1:400, Vasopressin 1:350, Oxytocin 1:200 und Meerrettich-Peroxidase 1:300.

Inkubationslösung („2. Antiserum“)

Das zweite Antiserum stellt ein Immunglobulin dar, das gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist. Es handelt sich um einen im Esel gewonnenen Antikörper, der gegen das Immunglobulin von Kaninchen gerichtet ist. Er wurde in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100 in der oben beschriebenen Inkubationslösung angesetzt.

Inkubationslösung (Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex / PAP)

Bei einem Teil dieses Komplexes handelt es sich um einen Antikörper, der im Kaninchen gegen injizierte Peroxidase gebildet wurde. An die beiden Fab-Fragmente des Antikörpers wurde aktive Peroxidase gebunden (Sternberger et al. 1970 und 1974). Der vorherbeschriebene zweite Antikörper bildet eine Brücke zwischen dem ersten Antikörper und diesem beschriebenen PAP-Komplex. Er wurde eingesetzt in einer Verdünnung von 1:75 bis 1:100. Da der Reaktionsablauf entscheidend von der Qualität der enzymatischen Wirkung des Peroxidase-Moleküls abhängig war und dieses sich bei Raumtemperatur nicht als haltbar erwies, mußte die Lösung jeweils frisch vor Reaktionsbeginn angesetzt werden. Ein längeres Aufheben des unverdünnten Komplexes war nur bei -20°C möglich. Aus diesem Grunde wurde die Stammlösung portioniert aufgehoben.

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

Mittels DAB (s.S. 28) gelingt eine lichtmikroskopische

Darstellung der spezifischen Immunkomplexbrücke. Die Peroxidase des PAP-Komplexes katalysiert Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (s.S. 28), das als Substrat dem DAB-Gemisch zugegeben wird. Es erfolgt eine Abspaltung von Sauerstoff aus H_2O_2 , der die 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Moleküle über eine Reduktion von Wasserstoff aneinander kettet. Es entsteht ein lichtabsorbierendes (braunes) Reaktionsprodukt, das sich nur an den Stellen ablagern kann, an denen die spezifische Peptidantikörperbrücke aufgebaut worden ist. 100 mg des DAB wurden in 50 ml Trispuffer gelöst und mittels Hinzugabe von 20 μ l H_2O_2 30%ig als Substrat wurde der Reaktionsablauf eingeleitet (s.S. 27).

Inkubationsschema

Da die Reaktion sowohl an Paraffin-Schnitten (7 μ m und 1,5 μ m) als auch an Gefrier- und Vibratomschnitten (120 μ m) ausgeführt wurde, mußte das Inkubationsverfahren der jeweiligen Schnittstärke angepaßt werden.

Reaktionsablauf an Paraffinschnitten

Das Paraffin wurde in herkömmlicher Weise (Romeis 1968) durch Xylol entfernt. Die Schnitte gelangten über absoluten Alkohol und eine Alkoholreihe absteigender Konzentrationen in destilliertes Wasser. Nach Überführen in Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden sie in den jeweiligen ersten Antikörper eingestellt. Sie wurden dort bei 4⁰ C im Kühlschrank mindestens 24 Stunden belassen. Es zeigte sich, daß je nach Peptid und entsprechender Qualität des Antikörpers sich Inkubationszeiten bis zu einer Woche als sehr vorteilhaft erwiesen. Nach Beendigung der Inkubation im ersten Antikörper erfolgte ein sorgfältiges Auswaschen der Inkubationslösung im Trisphosphatpuffer. Es wurde ein mindestens dreimaliger Pufferwechsel bei Einstellzeiten von jeweils 5 Minuten vorgenommen. Anschließend wurden die Schnitte

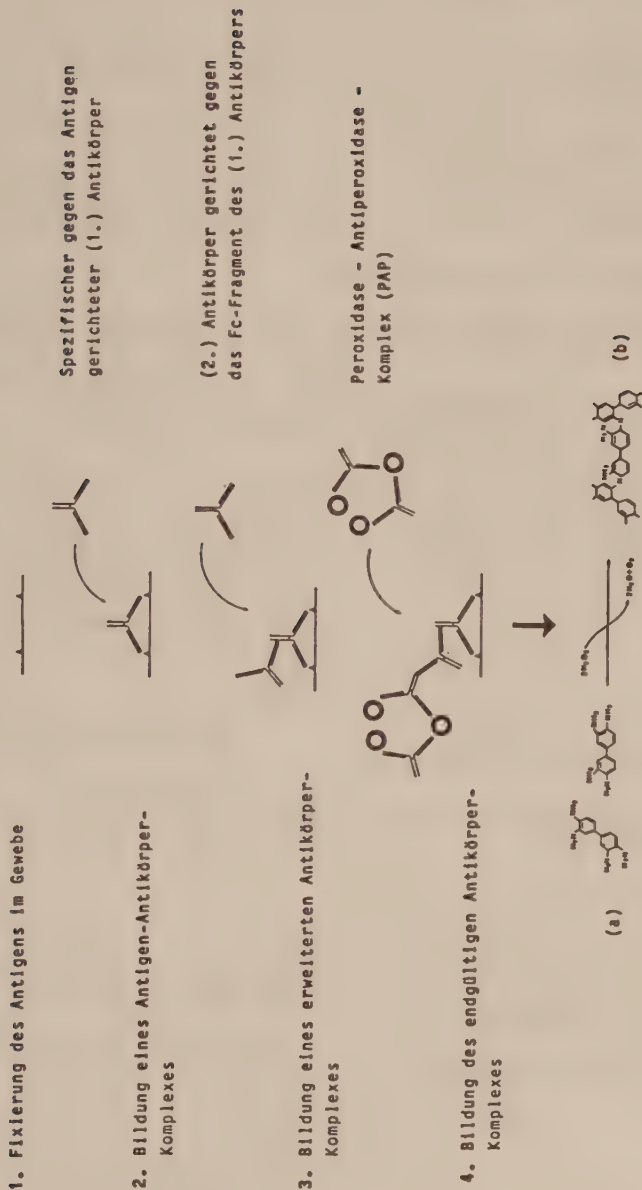
mit dem zweiten Antikörper ca. 1/2 Stunde inkubiert. Der zweite Antikörper wurde im Überschuß angeboten, längere Inkubationszeiten haben keine Besserung des Ergebnisses gebracht. Nach Ablauf der halben Stunde folgte der oben beschriebene Waschvorgang. Anschließend wurden die Schnitte horizontal in einer feuchten Inkubationskammer ausgelegt, mit der PAP-Lösung beträufelt und die Kammer mit einem Deckel abgedeckt. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten erwies sich auch hier als ausreichend. In der Zwischenzeit wurde die Diaminobenzidinlösung, wie oben beschrieben, hergestellt. Nach wiederum sorgfältigem Auswaschen des überschüssigen PAP-Komplexes wurden die Schnitte unter Zugabe von H_2O_2 in die Reaktionslösung eingestellt. In der Regel hatte sich nach ca. 5 Minuten das Reaktionsprodukt ausreichend in den Schnitt eingelagert. Bei rascher Zunahme der unspezifischen Hintergrundfärbung wurde die Reaktion früher unterbrochen. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Nach weiterer Behandlung mit Xylol und DePeX (einem synthetischen Einschlüßmittel; s.S. 29) standen sie für die lichtmikroskopische Auswertung zur Verfügung (Sofroniew und Schrell 1982).

Reaktionsablauf an Gefrierschnitten

Der Reaktionsablauf mußte für die Gefrier- bzw. für die Vibratomschnitte modifiziert werden. Aufgrund der Schnittdicke mußten sowohl die Inkubationszeiten als auch die Auswaschzeiten erheblich verlängert werden, da eine ungewöhnlich weite Diffusionsstrecke vorlag. Die Schnitte wurden in Zehnergruppen in Plastikgefäßen (Volumen ca. 50 ml) gesammelt; mittels Trisphosphatpuffer (pH 7,4) wurde das Fixans ausgewaschen. Der Waschvorgang dauerte mehrere Stunden unter mehrfach wiederholtem Wechseln des Puffers. Anschließend wurde der Antikörper in der oben beschriebenen Verdünnung zugefügt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen drei und fünf

Tagen. Das Auswaschen des Antikörpers wurde über mindestens sechs Stunden vorgenommen. Im zweiten Antikörper (Verdünnung 1:50) wurden die Schnitte mindestens 24 Stunden belassen. Es folgten wiederum Waschzeiten von sechs Stunden.

Es erwies sich als vorteilhaft, den PAP-Komplex bei einer Verdünnung von 1:200 bis 1:300 anzuwenden, um den unspezifischen Hintergrund senken zu können, da auch hier Diaminobenzidin entsprechend der auf S. 24 angegebenen Konzentration verwandt wurde. Die enzymatische Reaktion lief unter ständiger Bewegung ab und wurde nach Erreichen einer bestimmten Hintergrundfärbung abgebrochen. Die Schnitte wurden freischwimmend in der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum absoluten Alkohol entwässert, in Xylol gebracht, dann auf Objektträger aufgezogen und mit einem Einschlußmittel eingedeckt.



5. Polymerisation von 3,3' Diaminobenzidin (a) mittels der im Antikörperkomplex gebundenen Peroxidase als Katalysator und H_2O_2 als Substrat zu einem lichtabsorbierenden, braunen Polymerisationsprodukt (b)

2.11 Verwandte Chemikalien und Geräte

Liste 1:

VERWANDTE CHEMIKALIEN

a) Narkotika:

Nembutal		Abbott	Chicago/USA
Brevimytal		Lilly	Indianapolis/USA

b) Substanzen zur Transportstudie:

Meerrettich-Peroxidase (VI)	P 8375	Sigma	St. Louis/USA
Nonidet P 40 (NP 40)	N 6507	Sigma	St. Louis/USA

c) Substanzen zum immunhistochemischen Reaktionsablauf:

Tris-(Hydroxymethyl-amino-methan)	8382	Merck	Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	6345	Merck	Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	4873	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	6404	Merck	Darmstadt
Natriumazid	6688	Merck	Darmstadt
Lambda Carrageenan (IV)	C 3889	Sigma	St. Louis/USA
Triton-X-100	ohne Pro- duktnr.	Sigma	St. Louis/USA
2. Antikörper (2nd AB)		Wellcome	Beckenham/UK
Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)		Bio- Products	Brüssel
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	D 5637	Sigma	St. Louis/USA
Perhydrol 30%	7210	Merck	Darmstadt

d) Substanzen zur Gewebefixierung:

Formaldehyd-Lösung 35%	4003	Merck	Darmstadt
Pikrinsäure krist.	623	Merck	Darmstadt
Essigsäure (99-100%)			
Eisessig	E 56	Merck	Darmstadt
Quecksilber (II)-chlorid	4419	Merck	Darmstadt

e) Substanzen zur histologischen Einbettung:

Äthanol	6012	Merck	Darmstadt
Benzoessäuremethylester	6065	Merck	Darmstadt
Xylol	8681	Merck	Darmstadt
Paraplast Plus		Brunswick Labs.	St. Louis/USA
DePeX		BDH Chemical Ltd.	Poole/UK

Liste 2:

VERWANDTE GERÄTE

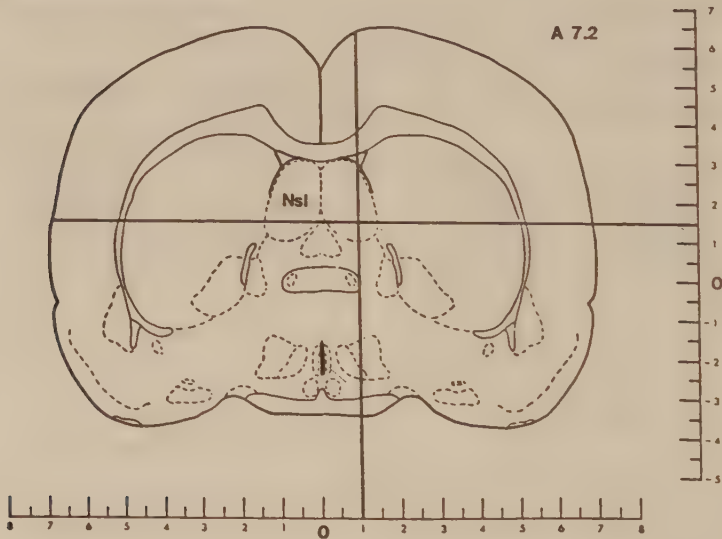
Stereotaxiegerät	DKI	1204	David Kopf Instruments	Tujunga/USA
Mikromanipulator	DKI	1760	David Kopf Instruments	Tujunga/USA
Auto-Cut	Modell	1140	Jung	Heidelberg
Kryostat			Dittes	Heidelberg
Vibratom			Oxford Lancer	Oxford/UK

3 ERGEBNISSE

3.1 Telencephalon

In den Nucleus septi lateralis mit den stereotaktischen Koordinaten A 7,2; H 1,5; L 1,0 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 8 Ratten injiziert.

Nucleus septi lateralis



An diesen Tieren wird ein gebündelter auffälliger Faserzug im Tractus corticohypothalamicus medialis gefunden. Er liegt dem vorderen Teil des 3. Ventrikels eng an (Tafel 1, Abb. 4), umfaßt den Nucleus suprachiasmaticus medial und ist bis in den vorderen Hypothalamus zu verfolgen.

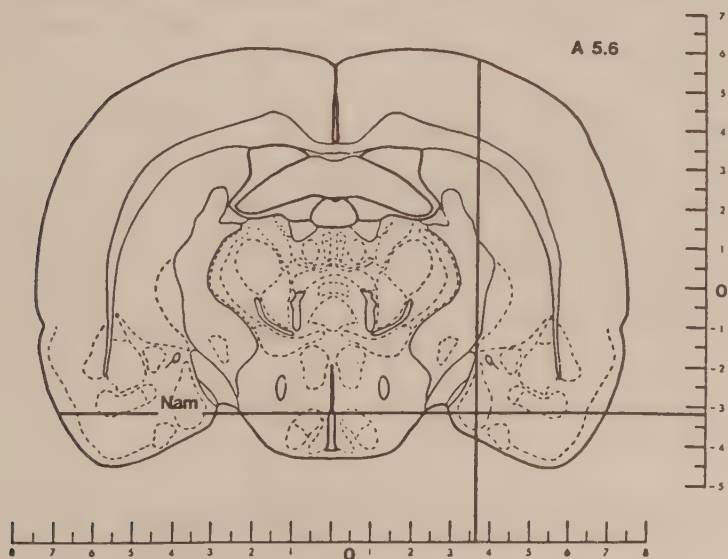
Obwohl der Faserzug den Nucleus suprachiasmaticus tangiert,

können in diesem Kerngebiet keine markierten Zellen nachgewiesen werden. Im Nucleus paraventricularis kommen deutlich markierte Neurone zur Darstellung (Tafel 1, Abb. 6,7)

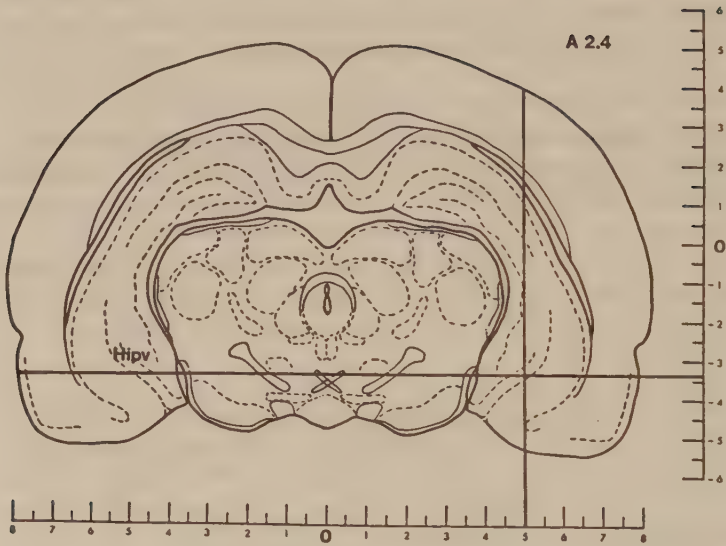
Nach König und Klippel (1967) können diese Zellen dem Nucleus paraventricularis pars magnocellularis zugeordnet werden. Die Qualität der Markierung läßt eine morphologische Unterteilung der Neurone zu. Es handelt sich um parvocelluläre Neurone vom bipolaren Typ mit einem Zelldurchmesser von 15 bis 20 μm . Außerdem wurden eine größere Anzahl von Neuronen im Nucleus parataenialis und eine geringere Anzahl im Nucleus interstitialis der Stria terminalis gefunden.

In den Nucleus amygdaloideus medialis mit den stereotaktischen Koordinaten A 5,6; H -3,2; L 3,7; den Hippocampus pars ventralis mit den stereotaktischen Koordinaten A 2,4; H -3,4; L 5,0; den Nucleus amygdaloideus centralis mit den stereotaktischen Koordinaten A 5,8; H -1,8; L 4,6 wurde Meerrettich-Peroxidase bei jeweils 4 Ratten injiziert.

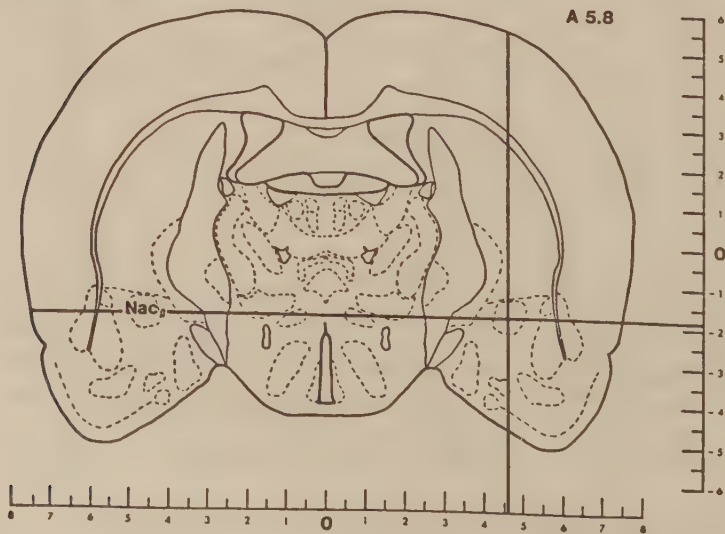
Nucleus amygdaloideus medialis



Hippocampus pars ventralis



Nucleus amygdaloideus centralis

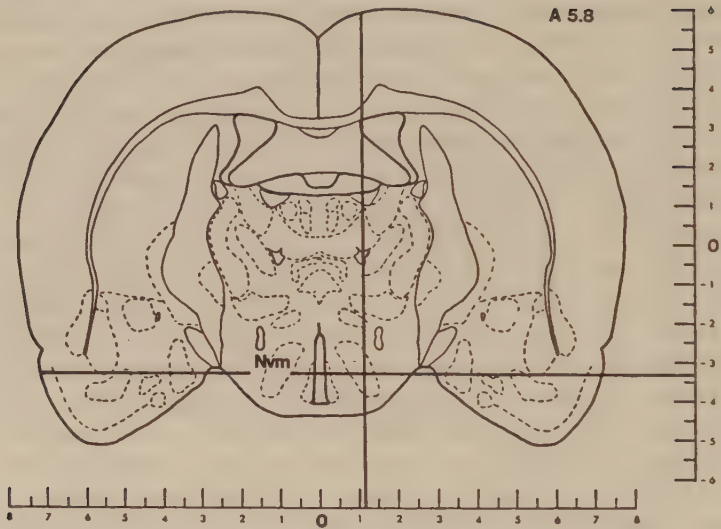


Übersichtsinjektionen, die den rostralen Bereich der Amygdala einschlossen, führten lediglich zur Anfärbung einzelner Zellen im Nucleus suprachiasmaticus. Diese Neurone wurden im ventromedialen Anteil des Kerngebietes gefunden. Der Faserverlauf zum Nucleus suprachiasmaticus wurde mittels der vergleichenden Dünnschnittmethode (1,5 μ m) untersucht. Eine Übereinstimmung zwischen Meerrettich-Peroxidase-markierten Zellen und Vasopressin enthaltenden Neuronen konnte nicht gefunden werden. Der Eindruck aus den Übersichtsschnitten, daß die Meerrettich-Peroxidase-markierten Zellen außerhalb des vasopressinergen Anteils des Nucleus suprachiasmaticus liegen, hat sich bestätigt. Eine vasopressinerge Verbindung des Nucleus suprachiasmaticus zum Nucleus amygdaloideus medialis besteht nicht. Injektionen, die den medialen Amygdalakern nicht überschritten, führten auch nicht zur Darstellung von retrograd markierten Zellen im Nucleus suprachiasmaticus. Hingegen wurde eine größere Anzahl parvocellulärer Neurone im Nucleus paraventricularis pars magnocellularis markiert. Injektionen in den ventralen Hippocampus und in die zentrale Amygdala zeigten keine markierten Zellen im Nucleus suprachiasmaticus. Einige wenige markierte Zellen ließen sich im Nucleus paraventricularis pars magnocellularis auffinden.

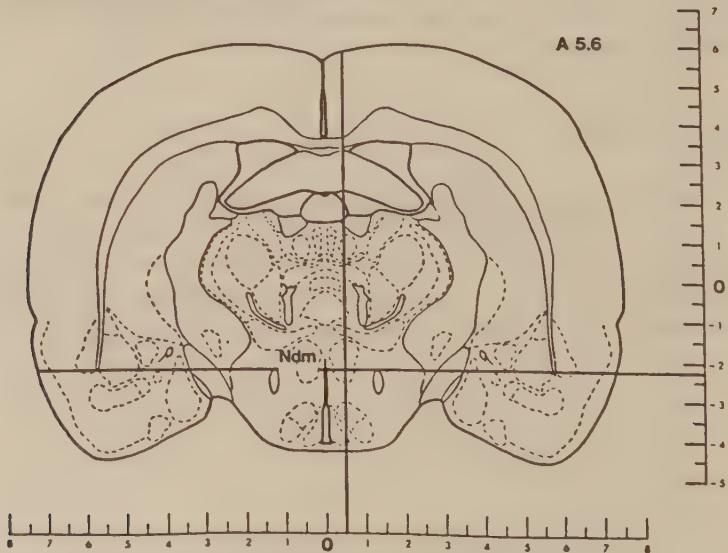
3.2 Diencephalon

In den Nucleus ventromedialis hypothalami mit den stereotaktischen Koordinaten A 5,8; H -3,3; L 1,2 und in den Nucleus dorsomedialis hypothalami mit den stereotaktischen Koordinaten A 5,8; H -2,3; L 0,5 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 4 bzw. 3 Ratten injiziert.

Nucleus ventromedialis hypothalami



Nucleus dorsomedialis hypothalami

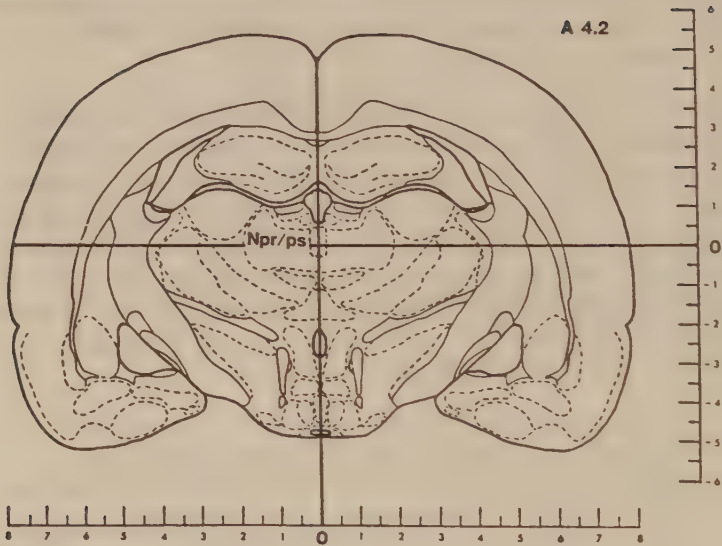


Übersichtsinjektionen, die mittels der Hamiltonspritze durchgeführt wurden, markierten aufgrund ihrer Größe in der Regel beide hypothalamischen Kerngebiete. Die iontophoretische Applikation von Meerrettich-Peroxidase erlaubte eine getrennte Markierung des Nucleus dorsomedialis und des Nucleus ventromedialis hypothalami.

Sowohl die Übersichtsinjektionen als auch die selektiven iontophoretischen Applikationen von Meerrettich-Peroxidase zeigten retrograd markierte Zellen im Nucleus suprachiasmaticus. Die Übersichtsschnitte wiesen eine Häufung von markierten Meerrettich-Peroxidase-Zellen im vasopressinergen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus auf. Die Anwendung des vergleichenden Dünnschnittverfahrens sicherten einen vasopressinergen Faserverlauf vom Nucleus suprachiasmaticus zu den Nuclei dorsomedialis et ventromedialis hypothalami.

In die Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis thalami mit den stereotaktischen Koordinaten A 4,2; H 0; L 0 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 7 Ratten injiziert. Die Meerrettich-Peroxidase-Injektionen erfolgten zentral in dieses beschriebene Kerngebiet unter Aussparung beider Habenulae (Tafel 2, Abb. 2).

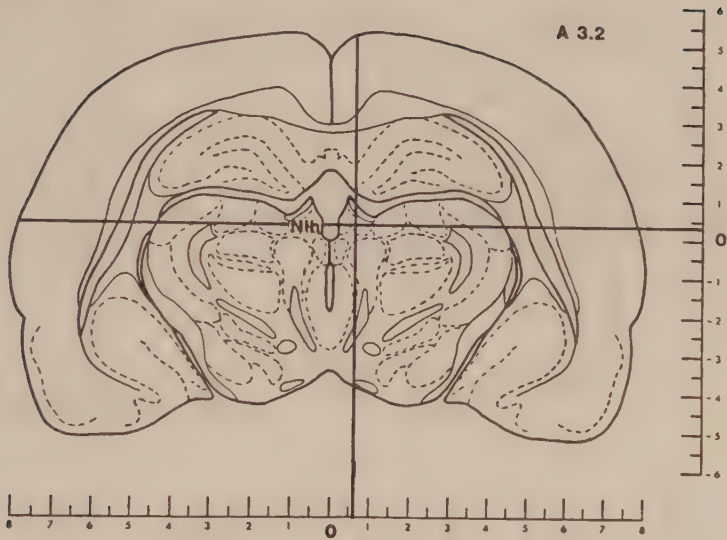
**Nuclei periventricularis rotundocellularis
et stellatocellularis thalami**



Ausnahmslos alle Injektionen zeigten eine massive Markierung des Nucleus suprachiasmaticus im rostralen Drittel des Kerngebietes, vorwiegend dorsal gelegen (Tafel 2, Abb. 7 und 8). Es entspricht dem vasopressinergen Neuronenanteil des Nucleus suprachiasmaticus. Mittels der vergleichenden Dünnschnittmethode (1,5 μ m) konnte gezeigt werden, daß sich unter den markierten Zellen vasopressinerge Neurone fanden (Tafel 3, Abb. 1 und 6).

In den Nucleus habenulae lateralis mit den stereotaktischen Koordinaten A 3,2; H 0,4; L 0,7 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 5 Ratten injiziert.

Nucleus habenulae lateralis

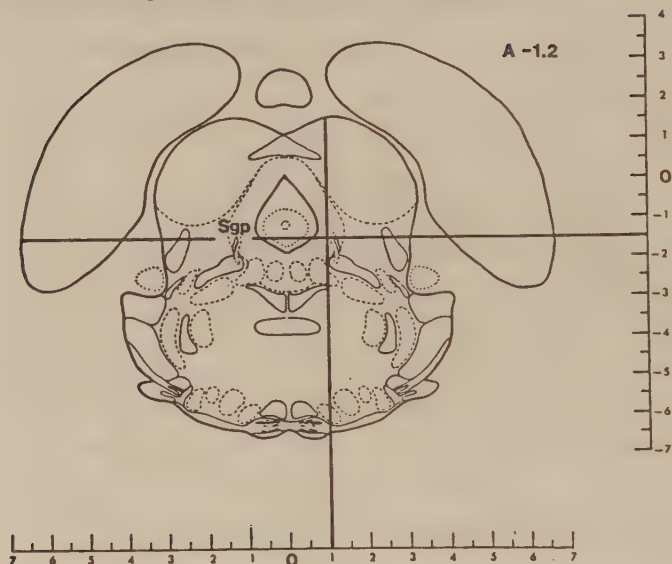


Nach sorgfältiger Analyse konnten weder im Nucleus paraventricularis noch im Nucleus suprachiasmaticus markierte Zellen nachgewiesen werden. Es fanden sich sowohl nach eng begrenzten iontophoretischen als auch nach der ausgedehnteren Injektion markierte Zellen im Nucleus der Stria terminalis.

3.3 Mesencephalon

In die Substantia grisea periventricularis mit den stereotaktischen Koordinaten A -1,2; H -1,5; L 1,0 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 8 Ratten injiziert.

Substantia grisea periventricularis



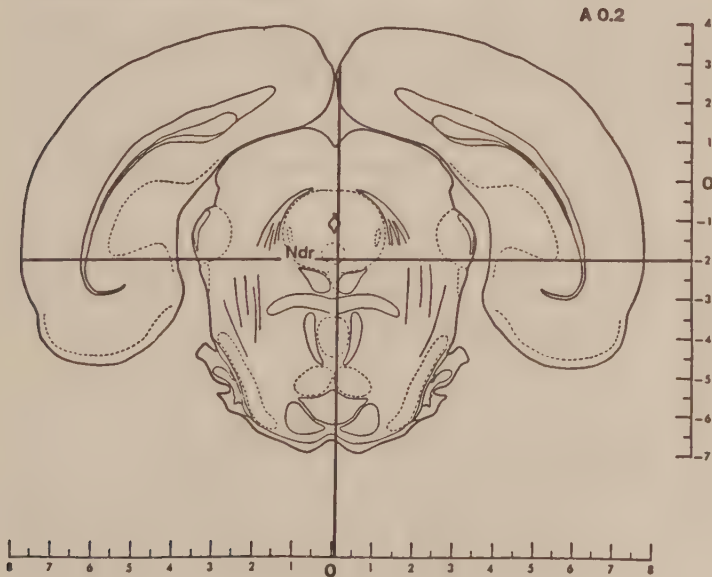
Übersichtsinjektionen mit 0,5 μ l Meerrettich-Peroxidase erbrachten den Nachweis von markierten Zellen im Nucleus supra-chiasmaticus, die sich über das gesamte Kerngebiet verteilen und auch im mediodorsalen vasopressinergen Teil des rostralen Drittels finden. Außerdem wurden im kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis pars magnocellularis markierte Neurone vom parvocellulären Typ gefunden.

Eine Injektionsserie mit kleineren Mengen von Meerrettich-Peroxidase (kleiner 0,1 μ l) zeigte zum Teil keine, zum Teil nur vereinzelte Zellen im Nucleus supra-chiasmaticus außerhalb des vasopressinergen Neuronenanteils. In allen Fällen fanden sich wenn auch in geringerer Anzahl als in der Übersichtsinjektion markierte Zellen im Nucleus paraventricularis.

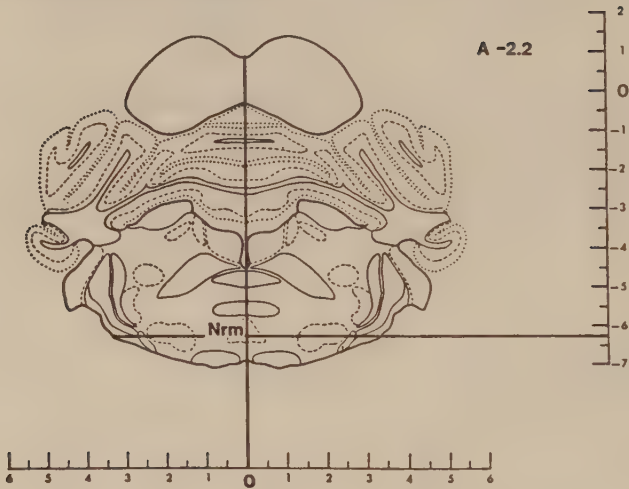
Mittels der vergleichenden Dünnschnittmethode ($1,5 \mu\text{m}$) konnten wir keine Übereinstimmung der Meerrettich-Peroxidase markierten Zellen im Nucleus suprachiasmaticus mit Vasopressin-produzierenden Neuronen dieses Kerns finden.

In den Nucleus raphes dorsalis mit den stereotaktischen Koordinaten A 0,2; H -2,0; L 0,1 und in den Nucleus raphes magnus mit den stereotaktischen Koordinaten A -2,2; H -6,3; L 0 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 5 bzw. 4 Ratten injiziert.

Nucleus raphes dorsalis



Nucleus raphes magnus

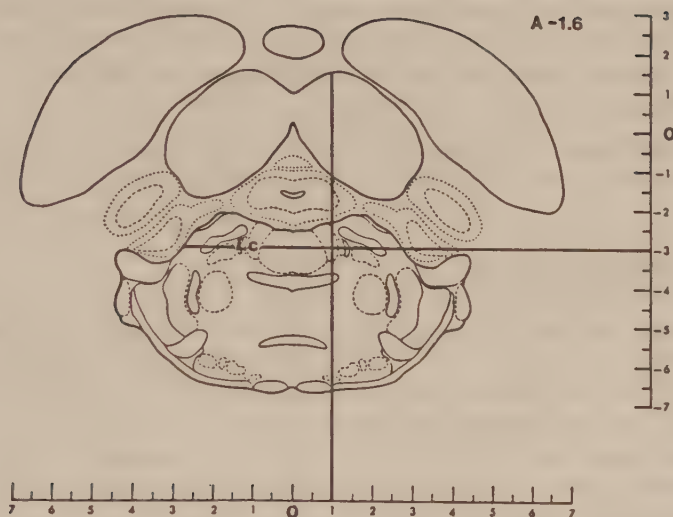


Nach Injektion in beide Kerngebiete wurden keine markierten Neurone im Nucleus suprachiasmaticus gefunden, hingegen im kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis.

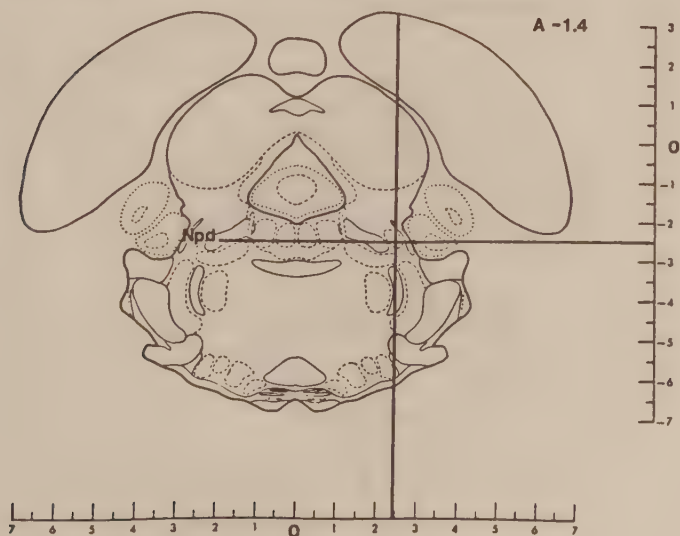
3.4 Pons

In den Locus coeruleus mit den stereotaktischen Koordinaten A -1,6; H -3,0; L 1,0 und den Nucleus parabrachialis dorsalis mit den stereotaktischen Koordinaten A -1,4; H -2,5; L 2,5 wurde Meerrettich-Peroxidase bei 3 bzw. 4 Ratten injiziert.

Locus coeruleus



Nucleus parabrachialis dorsalis



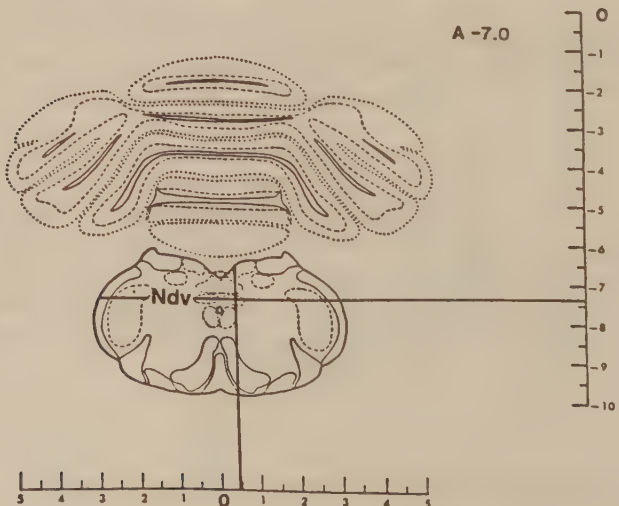
Die Auswertung beschränkt sich auf den Hypothalamus, einschließlich der präoptischen Region. Nach Injektion in den Nucleus parabrachialis dorsalis fanden sich keine markierten Neurone im Nucleus suprachiasmaticus, jedoch solche im Nucleus paraventricularis.

Injektionen in den Locus coeruleus erbrachten ebenfalls keine markierten Zellen im Nucleus suprachiasmaticus.

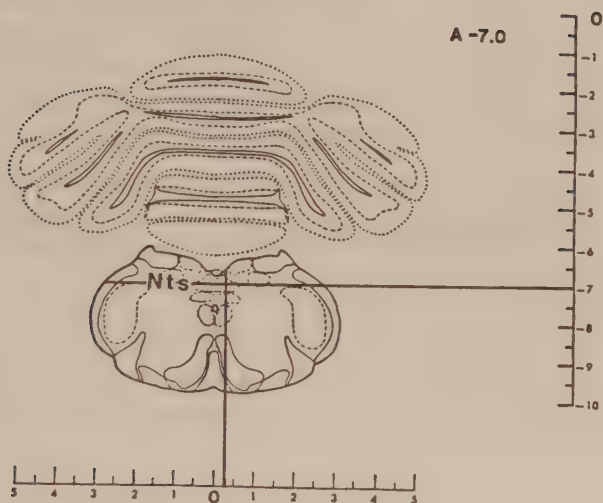
3.5 Medulla oblongata

In den Nucleus dorsalis vagi mit den stereotaktischen Koordinaten A -7,0; H -7,4; L 0,4; den Nucleus tractus solitarii mit den stereotaktischen Koordinaten A -7,0; H -7,0; L 0,3 und den Nucleus ambiguus mit den stereotaktischen Koordinaten A -5,6; H -7,5; L 1,8 wurde Meerrettich-Peroxidase bei jeweils 4 Ratten injiziert. Dies erfolgte wie im methodischen Teil der Arbeit beschrieben (s.S. 15 / 2.3) unter Sicht nach Eröffnung der atlanto-okzipitalen Membran über der Cisterna magna in Kombination mit den Koordinaten.

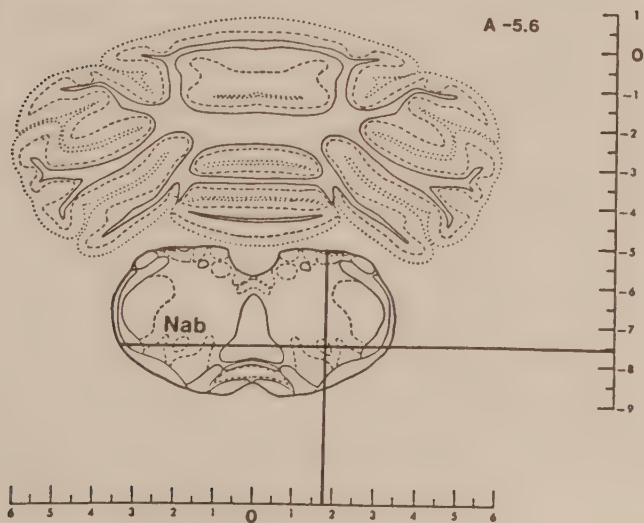
Nucleus dorsalis vagi



Nucleus tractus solitarii



Nucleus ambiguus



Übersichtsinjektionen mit einer verhältnismäßig großen Menge von Meerrettich-Peroxidase (2 μ l, 30%ig), deren Diffusionsbereich jeweils eine Hälfte des Hirnstammes einnahm, führten zu keiner Darstellung von Neuronen im Nucleus suprachiasmaticus, hingegen fanden sie sich in großer Zahl im kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis.

Mittels der iontophoretischen Applikation von Meerrettich-Peroxidase wurden die Projektionen dieser Terminalgebiete selektiv untersucht. Jedem dieser Terminalgebiete konnten vasopressinerge Neurone im kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis zugeordnet werden (Tafel 5, Abb. 6 und 8). Mittels der vergleichenden Dünnschnittmethode (1,5 μ m) konnte für jedes dieser Terminalgebiete eine vasopressinerge und eine oxytocinerge Projektion nachgewiesen werden (Tafel 6, Abb. 1, 2, 3).

BILDTEIL ZU DEN ERGEBNISSEN

BILDTAFEL 1: NUCLEUS SEPTI LATERALIS

Abb. 1 Vasopressin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Paraffinschnittes (7 μ m) im dorsalen Septum. Nucleus septi lateralis, Nucleus caudatus-putamen, Truncus corporis callosi und Commissura anterior. Pfeil ($\longrightarrow$) weist auf das vasopressinerge Terminalgebiet im Nucleus septi lateralis hin (x 40).

Abb. 2 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Gefrierschnittes (120 μ m), gleiche Schnittebene wie in Abb. 1. Das Reaktionsprodukt markiert Zentrum und Umfeld der injizierten Meerrettich-Peroxidase (x 40).

Abb. 3 Vasopressin-Immunperoxidase-Reaktion. Ausschnitt aus Abb. 1. Im vasopressinergen Terminalgebiet des lateralen Septums bilden die Fasern ein dichtes Netzwerk um die Perikaryen (x 200). Die Bildachse ist gegenüber Abb. 1 um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht.

Abb. 4 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Frontaler Gefrierschnitt (120 μ m) im rostralen Hypothalamus mit Chiasma opticum, Nucleus suprachiasmaticus und 3. Ventrikel. Pfeil ($\longrightarrow$) weist auf einen markierten Faserzug, der sich der Stria terminalis pars hypothalamica und dem Tractus corticohypothalamicus medialis zuordnen läßt. Dieses Faserbündel tangiert den Nucleus suprachiasmaticus an seinem mediobasalen Anteil (x 160).

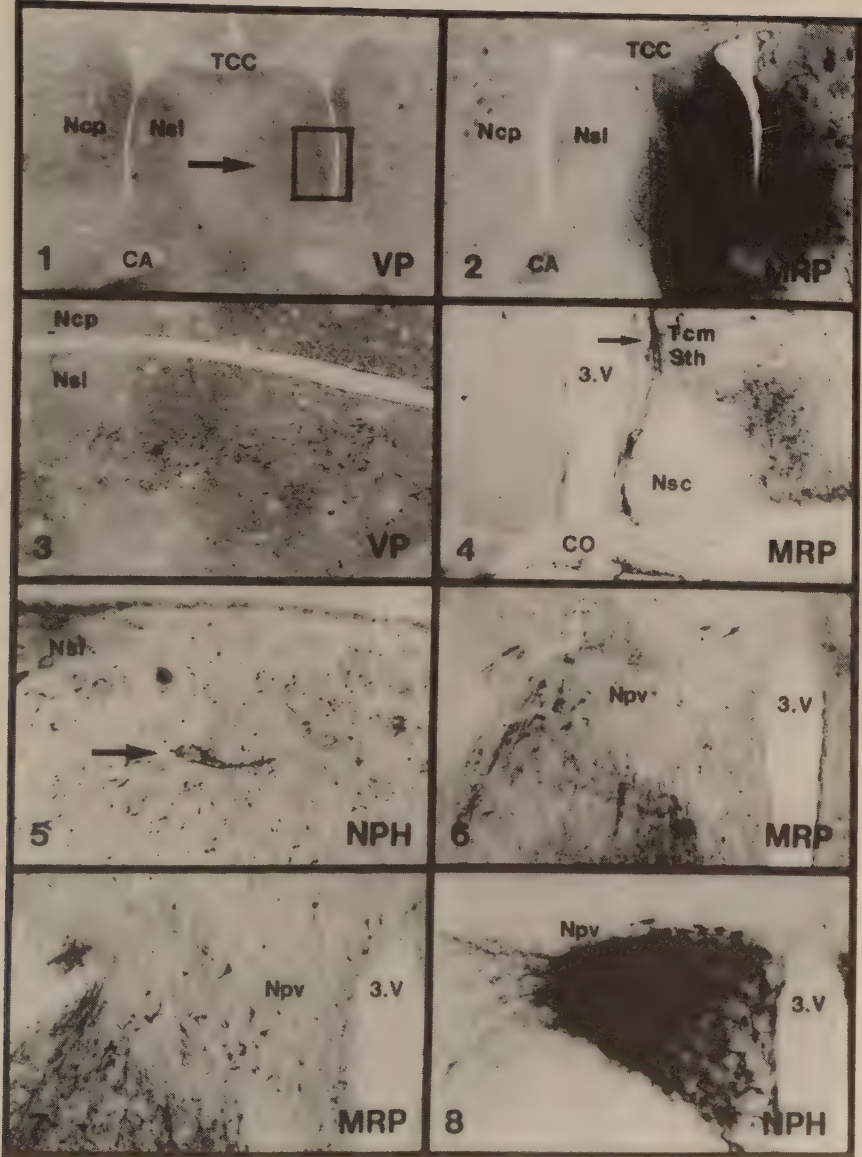
Abb. 5 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Ausschnitt aus Abb. 3. Es kommt deutlich der perlschnurartige Charakter der Axonterminalen zur Darstellung. Pfeil ($\longrightarrow$) markiert ein Axon, das ein Perikaryon des Nucleus septi lateralis umschließt und axosomatische Kontakte bildet (x 400).

Abb. 6 Meerrettich-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Gefrierschnittes (120 μ m) des rostralen Anteils des Nucleus paraventricularis der Ratte. Markierte Neurone in der lateralen Spitze des parvocellulären Anteils des Nucleus paraventricularis hypothalami (x 100).

Abb. 7 Meerrettich-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Gefrierschnittes (120 μ m). Kaudaler Nachbarschnitt zu Abb. 6. Peroxidase-markierte Neurone in der ventralen Untergruppe des parvocellulären sowie in der lateralen Untergruppe des posterioren magnocellulären vasopressinergen Anteils des Nucleus paraventricularis (x 100).

Abb. 8 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Frontaler Gefrierschnitt (120 μ m). Kaudaler Anteil des Nucleus paraventricularis, Neurophysin-produzierende Neuronenpopulation. Die markierten Neurone der Abb. 6 und 7 lassen sich dem Neurophysin, Vasopressin und Oxytocin enthaltenden Neuronenanteil des Kerngebietes zuordnen (x 100).

BILDTAFEL 1



BILDTAFEL 2: NUCLEI ROTUNDOCELLULARIS ET STELLATOCELLULARIS
THALAMI

Abb. 1 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Paraffinschnittes (7 μm). Mediodorsaler Thalamus mit dem Nucleus periventricularis stellatocellularis, der Neurophysin-immunreaktive Terminalen enthält (x 63).

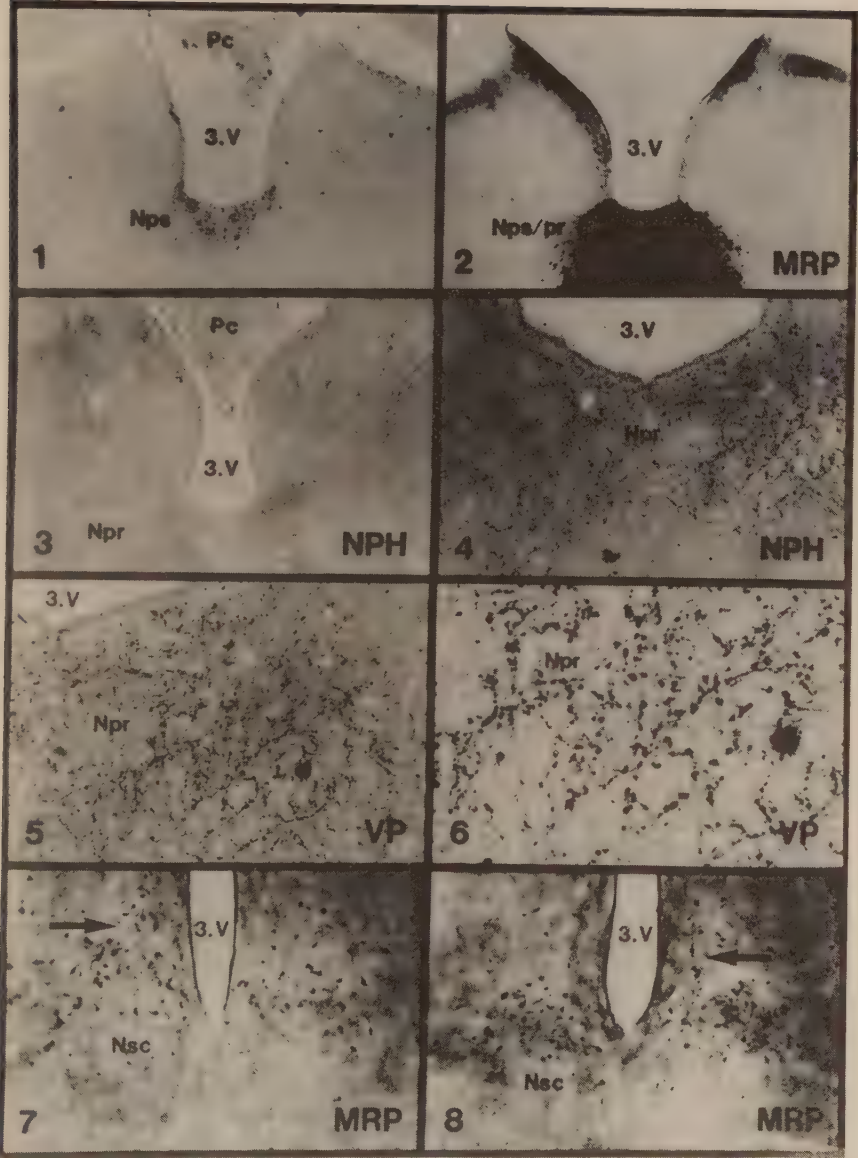
Abb. 2 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Gefrierschnittes (120 μm). Gleiche Schnittebene wie Abb. 1. Meerrettich-Peroxidase wurde zentral unter Schonung der beiden Habenulae in den Nucleus periventricularis thalami injiziert. Die in Abb. 1 und Abb. 3 beschriebenen Terminalgebiete liegen im Zentrum der Injektionen (x 63).

Abb. 3, Abb. 4 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Paraffinschnittes (7 μm). Kaudal gelegener Parallelschnitt zu Abb. 1. Kerngebiet des Nucleus periventricularis rotundocellularis thalami; Neurophysin-immunreaktive Terminalen. Abb. 3 (x 63); Abb. 4 (x 320).

Abb. 5, Abb. 6 Vasopressin-Immunperoxidase-Reaktion. Ringförmige Anordnung der vasopressinergen Terminalen um die Perikaryen des Nucleus periventricularis rotundocellularis thalami. Abb. 5 (x 400); Abb. 6 (x 640).

Abb. 7, Abb. 8 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Benachbarte Vibratomschnitte (120 μm). Markierte Neurone in beiden Nuclei suprachiasmatici (mediolateraler Teil des dorsalen Abschnittes). Ein Teil der Neurone läßt sich (→) in dorsaler Richtung über die Grenzen des Nucleus suprachiasmaticus hinaus nachweisen (x 160).

BILDTADEL 2



BILDTAFEL 3: NACHWEIS VON RETROGRADER PEROXIDASE-MARKIE-
RUNG UND NEUROPEPTIDEN IN EINEM EINZELNEURON
DES NUCLEUS SUPRACHIASMATICUS

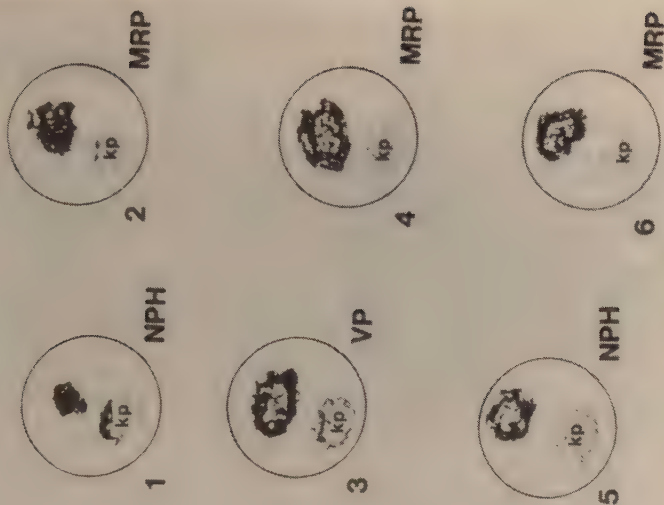
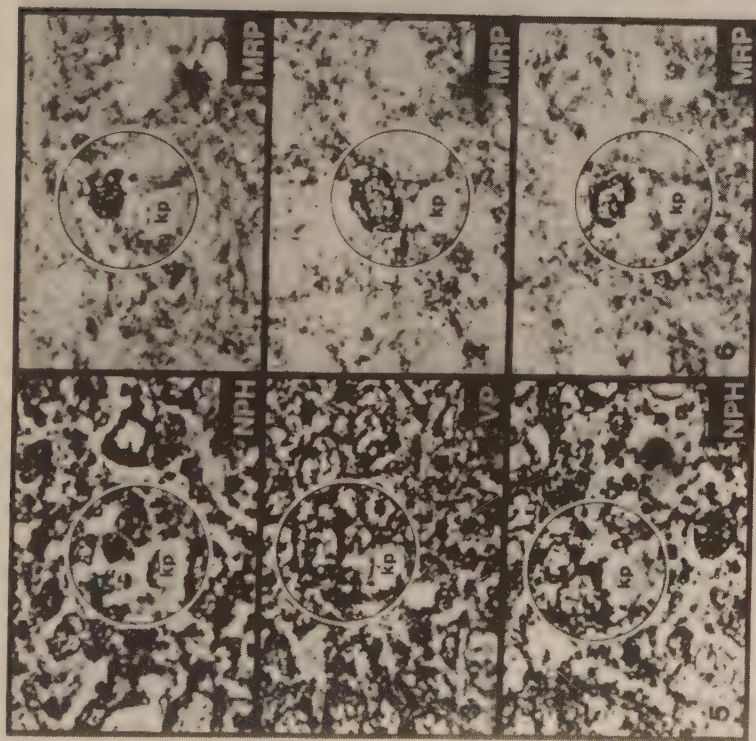
Abb. 1 - 6 Frontale Serienschnitte (7 μ m Paraffin) in lückenloser Folge. Dargestellt sind abwechselnd endogenes Peptid und retrograd transportierte Meerrettich-Peroxidase in ein und demselben Perikaryon.

Abb. 1, Abb. 5 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion.

Abb. 3 Vasopressin-Immunperoxidase-Reaktion.

Abb. 2, Abb. 4, Abb. 6 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Die hohe Dichte der Neurophysin- und Vasopressin-positiven Neuronenpopulation im Nucleus suprachiasmaticus erschwert das Auffinden der betreffenden Zelle. Als Orientierungshilfe dient eine benachbarte Kapillare (Phasenkontrast (x 800)).

BILDTAFEL 3



BILDTAFEL 4: NUCLEUS RAPHE DORSALIS

Abb. 1 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Paraffinschnittes (7 μm). Der Nucleus raphe dorsalis zeigt eine geringe Dichte an Neurophysin-positiven Terminalen (x 63).

Abb. 2 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Vibratomschnittes (120 μm). Schnittebene wie in Abb. 1. Das Injektionsgebiet schließt unilateral den Nucleus raphe dorsalis ein (x 63).

Abb. 3, Abb. 4 Ausschnitte aus Abb. 1. Auch hier zum Teil ringförmige Anordnung perlschnurartiger Terminalen.

Abb. 3 (x 400); Abb. 4 (x 640).

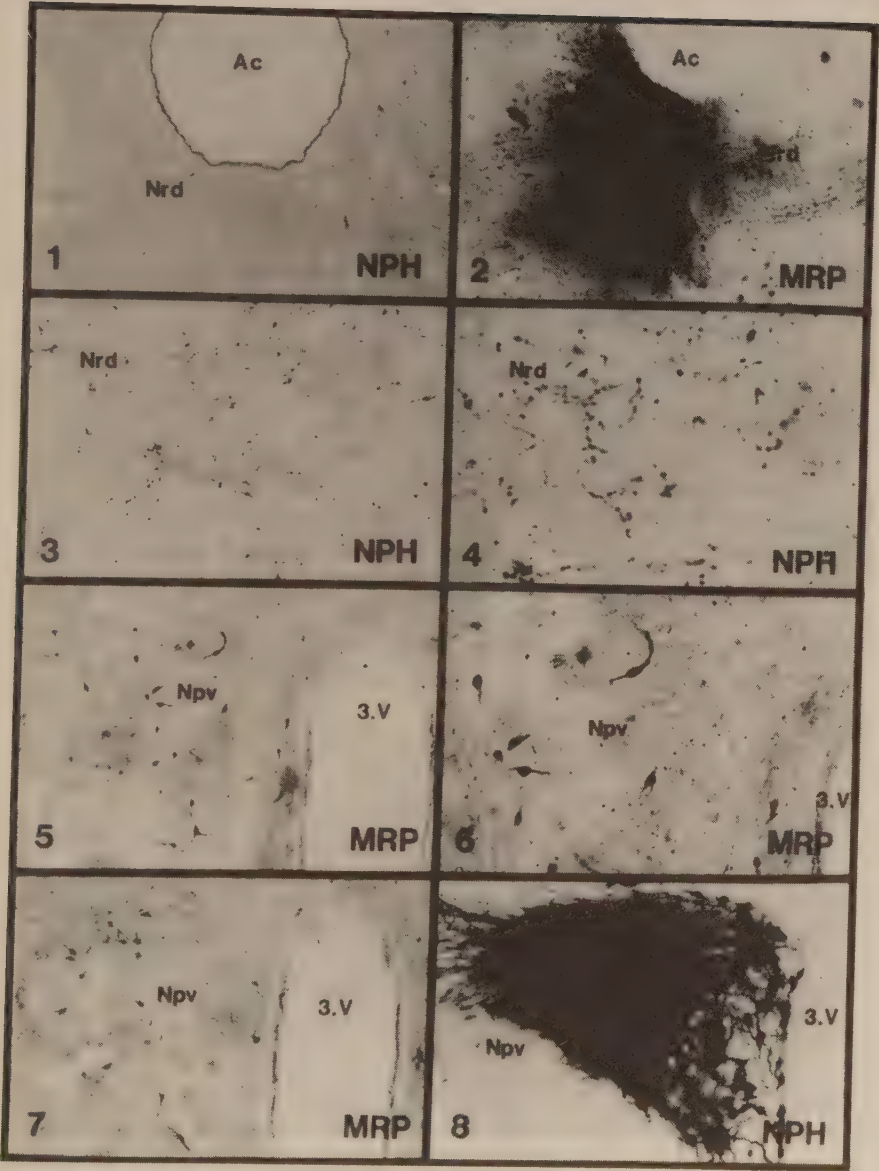
Abb. 5, Abb. 6 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht (Abb. 5) und Vergrößerung (Abb. 6) eines frontalen Gefrierschnittes (120 μm) durch den Nucleus paraventricularis. Peroxidase-markierte Zellen in der lateralen Gruppe des posterioren magnocellulären Anteils.

Abb. 5 (x 160); Abb. 6 (x 400).

Abb. 7 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion. Frontaler Vibratomschnitt (120 μm); kaudaler Nachbarschnitt zu Abb. 5. Markierte Zellen im dorsal gelegenen Teil des lateralen parvocellulären Anteils des Nucleus paraventricularis (x 160).

Abb. 8 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Vibratomschnittes (120 μm) mit kaudalem Anteil des Nucleus paraventricularis. Diese Abbildung verdeutlicht in der Gegenüberstellung mit Abb. 5 und Abb. 7 die Dichte der peptidergen Neuronenpopulation im Nucleus paraventricularis (x 160).

BILDTAFEL 4



BILDTAFEL 5: MEDULLA OBLONGATA

Abb. 1 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Übersicht eines frontalen Paraffinschnittes (7 μ m). Dargestellt sind der Nucleus tractus solitarii und der Nucleus dorsalis vagi. Das Terminalgebiet des Nucleus dorsalis vagi liegt dorsal des Canalis centralis (x 200).

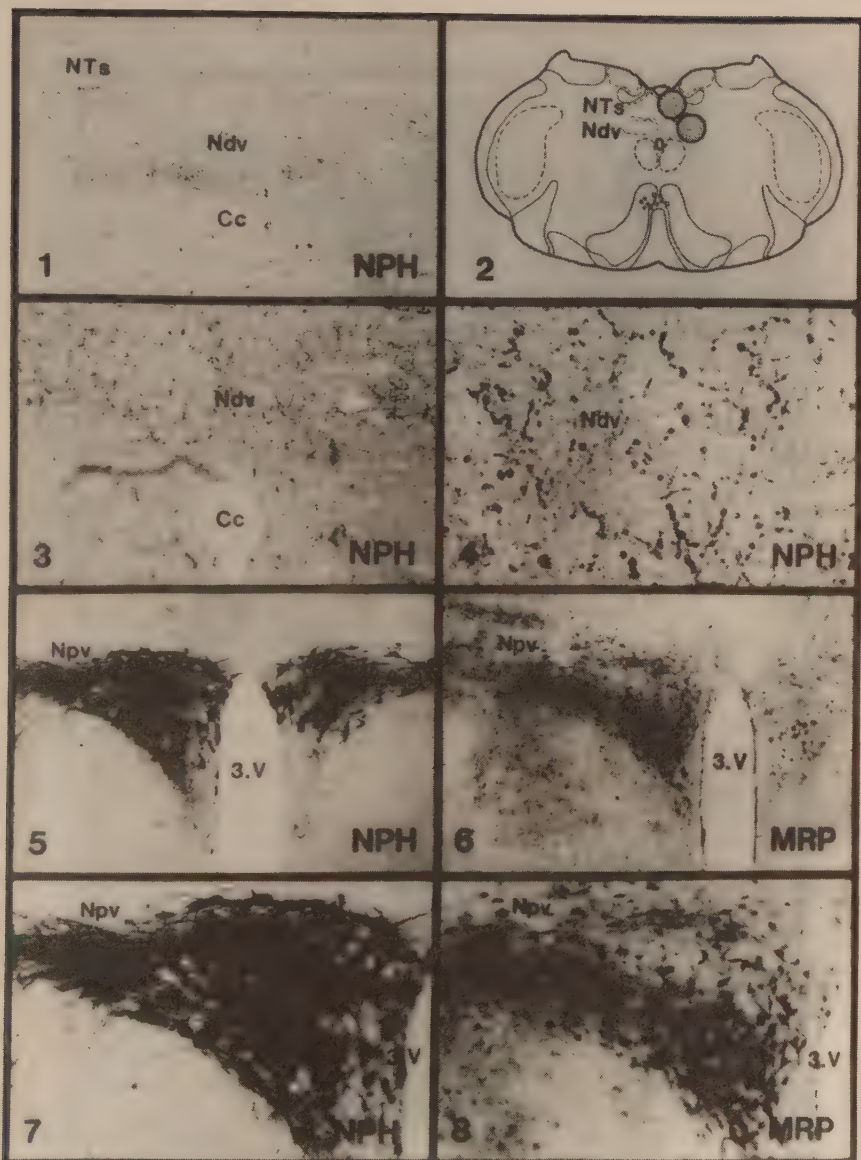
Abb. 2 Zeichnung der Injektionszentren des Nucleus tractus solitarii und des Nucleus dorsalis vagi in der Medulla oblongata.

Abb. 3, Abb. 4 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion. Vergrößerungen aus Abb. 1. Ringförmige Anordnung der Terminalen um die Perikaryen. Abb. 3 (x 300); Abb. 4 (x 640).

Abb. 5, Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8

Abb. 5 und 6 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion (x 100). Abb. 7 und 8 Meerrettich-Immunperoxidase-Reaktion (x 160). Frontale Gefrierschnitte (120 μ m) durch den kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis. Die Gegenüberstellung der korrespondierenden Schnittebenen verdeutlicht, daß die Peroxidase-markierten Zellen (Abb. 6 und 8) mit der Lokalisation der peptidergen Neurone des Nucleus paraventricularis übereinstimmen. Zum Identitätsnachweis siehe Tafel 6.

BILDTADEL 5



BILDTAFEL 6: NUCLEUS PARAVENTRICULARIS HYPOTHALAMI

Abb. 1 - 3 Frontale Paraffinschnitte (1,5 μm) in lückenloser Folge im Nucleus paraventricularis.

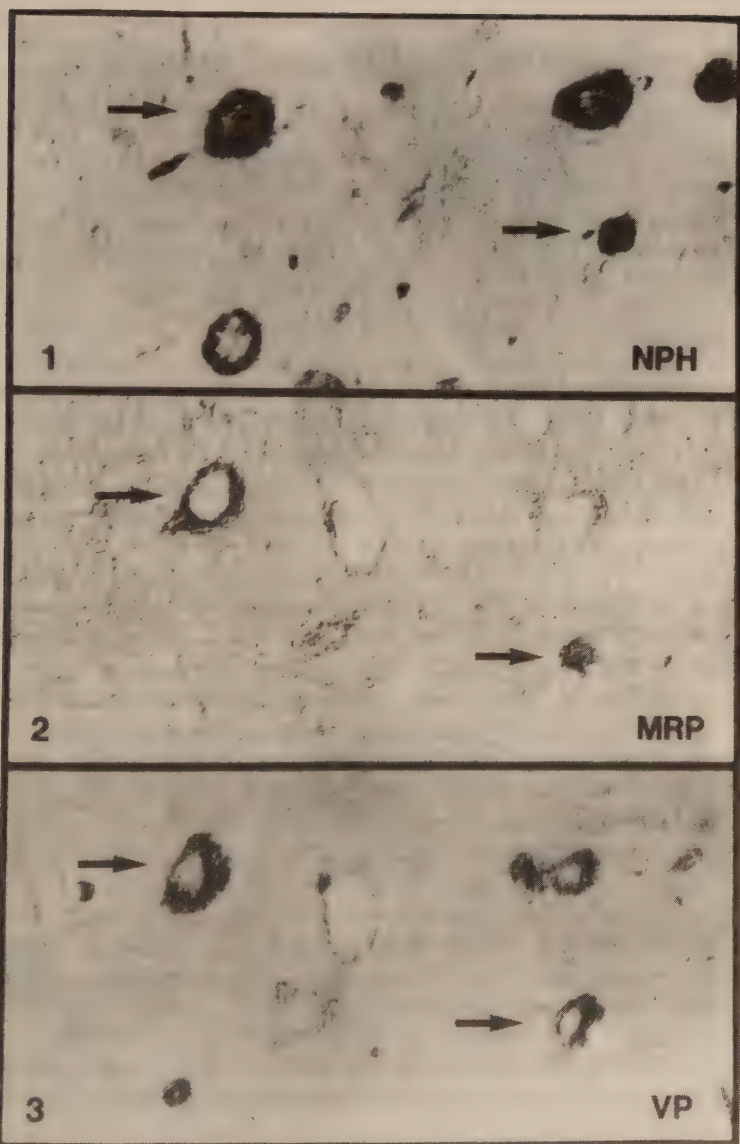
Abb. 1 Neurophysin-Immunperoxidase-Reaktion.

Abb. 2 Meerrettich-Peroxidase-Immunperoxidase-Reaktion.

Abb. 3 Vasopressin-Immunperoxidase-Reaktion.

Markierte Neurone nach Injektion von Meerrettich-Peroxidase in den Nucleus dorsalis vagi. Ventraler Anteil des lateralen (vasopressinergen) Bereichs des posterioren magnocellulären Teils des Nucleus paraventricularis. Die beiden mit Pfeil ($\longrightarrow$) gekennzeichneten Perikaryen enthalten Neurophysin (Abb. 1), Vasopressin (Abb. 3) und sind retrograd mit Peroxidase (Abb. 2) markiert (x 800).

BILDTAFEL 6



4 DISKUSSION

4.1 Kritik zur Meerrettich-Peroxidase-Methode

Die gebräuchlichen Fixierungsmittel wie Formaldehyd, Paraformaldehyd, Glutaraldehyd und auch Pikrinsäure-Lösung führen je nach Konzentration zu einer Zerstörung der enzymatischen Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (La Vail 1975, Kim und Strick 1976). Schon geringe Konzentrationen wie eine 2,5%ige Formaldehydlösung können die enzymatische Aktivität der Peroxidase vollständig inaktivieren (Malmgreen und Olsson 1978).

Zur morphologischen Darstellung von Meerrettich-Peroxidase bedarf es aber einer guten Gewebserhaltung. Entscheidend zur Erkennung der Neurone nach der Methode von Mesulam (1976) ist, daß die injizierte Peroxidase ihre enzymatische Aktivität für die Oxidation eines Benzidinderivates durch H_2O_2 durch das Fixans nicht verloren hat.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode unterscheidet sich von dem enzymatischen Nachweis grundsätzlich. Zur Darstellung akkumulierter Meerrettich-Peroxidase in Neuronen wird anstelle der enzymatischen Aktivität der Peroxidase die Antigenität ihrer Eiweißstruktur benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die Peptid-Struktur der Meerrettich-Peroxidase (im Kaninchen) erzeugt. Im Gegensatz zur enzymatischen kann bei der immunhistochemischen Methode das Fixans in einer Konzentration angewandt werden, die zu einer guten Gewebserhaltung führt.

Wir haben als Fixans die Bouinsche Lösung angewandt, da sie sowohl das zentrale Nervengewebe als auch die antigene Natur exogener und endogener Peptide gut erhält.

Bei ventrikulärer Injektion von Meerrettich-Peroxidase liegt die Diffusionsgeschwindigkeit bei 0,5 mm/h (Van Deurs 1977). Nach ca. 24 Stunden ist im ZNS keine Peroxidase mehr

nachweisbar. Sie wird über den Liquor cerebrospinalis ausgewaschen und über die Kapillaren in den Blutstrom abgegeben (Broadwell und Brightman 1976).

Die Injektion von Meerrettich-Peroxidase in das Hirngewebe erzeugt je nach applizierter Menge einen Injektionshof von einem bis mehreren Millimetern. Entsprechend dem Konzentrationsgefälle findet sich im Zentrum der Injektion eine dunkle, dicht angefärbte Reaktionszone, die sich zur Peripherie hin aufhellt. Terminalen, die im Bereich dieses Diffusionsgebietes liegen, nehmen Peroxidasmoleküle auf, und transportieren diese zum Zelleib. Erst wenn eine genügend große Menge an Peroxidase-Molekülen nach retrogradem Transport im Perikaryon akkumuliert ist, ist diese immunhistochemisch nachweisbar.

Nach Kuypers et al. (1974) sind mit der Meerrettich-Peroxidase-Methode nicht alle neuronalen Bahnen darstellbar. Jones und Hartman (1978) weisen auf die zu geringe Empfindlichkeit der histochemischen Nachweismethode hin. Daher schließen negative Ergebnisse nach Anwendung der Meerrettich-Peroxidase-Methode die Existenz einer Projektion nicht unbedingt aus.

Eine weitere Fehlermöglichkeit ist dadurch gegeben, daß durch das Gebiet ziehende Fasern durch die Injektionskanüle verletzt wurden. Kristensson und Olsson (1974, 1975 und 1976) sowie Adams und Warr (1976) haben nachgewiesen, daß durchtrennte Axone in genügender Menge Peroxidase-Moleküle aufnehmen, diese zum Perikaryon transportieren und sich histochemisch darstellen lassen. Diese Perikaryen stellen eine Quelle für mögliche Fehlinterpretationen dar.

Diaminobenzidin ist das am längsten und häufigsten verwandte Chromogen, das zum Nachweis von endogener Peroxidase, wie sie beispielsweise in Erythrocyten vorkommt, benutzt wird (Graham und Karnovsky 1966). In den letzten Jahren wurde

darauf hingewiesen, daß Diaminobenzidin (DAB) karzinogene Eigenschaften aufweist. Die von Mesulam (1976) und Hardy und Heimer (1977) verwandten Benzidinderivate (Benzidindihydrochlorid und Tetramethylbenzidin) zeigten in unserer Versuchsanordnung deutlich schlechtere Ergebnisse als das DAB. Bei entsprechender Sorgfalt (Verwendung von Einmalhandschuhen) im Umgang mit DAB kann davon ausgegangen werden, daß eine Gefährdung von Personen auf ein unbedeutendes Maß herabgesetzt ist.

4.2 Kritische Betrachtung der mittels Peroxidase dargestellten Projektionen

4.2.1 Telencephalon

Der Nucleus septi lateralis hat nach von Gudden (1881) und Vogt (1898) eine Verbindung zum Nucleus habenulae medialis. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Herkenham und Nauta (1977), die Meerrettich-Peroxidase in den medialen Habenulakern injizierten, konnten Swanson und Cowan (1979) autoradiographisch (anterograd) nachweisen, daß der Ursprung der oben beschriebenen Faserverbindung vom Nucleus septi lateralis ausgeht. Raisman (1976) beschreibt in einer Übersichtsarbeit Verbindungen des Nucleus septi lateralis zum Hypothalamus, zu Kerngebieten des Telencephalon sowie zur Medulla oblongata, die ihrerseits wieder mit dem Hypothalamus verknüpft sind. Ergebnisse, die dem Nucleus septi lateralis eine Beteiligung am Motivations- und Emotionsverhalten als auch an assoziativen Vorgängen zuschreiben, werden von De France (1976) berichtet.

Die hohe Dichte von Vasopressin-Terminalen im lateralen Septum und die Beobachtung, daß die Vasopressinfasern vom Nucleus suprachiasmaticus im vorderen Hypothalamus aufsteigen, bevor sie kaudalwärts weiterziehen, legte für die Autoren Sofroniew und Weindl (1978 a und b) und Bujis (1978) den Schluß nahe, daß das vasopressinerge Terminalgebiet des

lateralen Septums (Tafel 1, Abb. 1, 3, 5) vermutlich vom Nucleus suprachiasmaticus innerviert wird. Gestützt wird diese These scheinbar durch die Befunde von Berk und Finkelstein (1981 a und b), die nach Injektion von Tritium-markiertem Leucin in den Nucleus suprachiasmaticus eine Markierung im ventralen Bereich des lateraln Septums fanden. Bei genauer Prüfung der Abbildung dieser Autoren sieht man, daß die Markierung außerhalb des vasopressinergen Terminalgebietes liegt und die Injektion über den Nucleus suprachiasmaticus hinausgeht.

Stephan et al. (1981) bestritten eine Projektion vom Nucleus suprachiasmaticus zum lateralen Septum. Conrad und Pfaff (1976 a), die Tritium-markierte Aminosäuren in den Nucleus interstitialis der Stria terminalis sowie in den Nucleus paraventricularis (Conrad und Pfaff 1976 b) injizierten, zeigten eine von beiden Kerngebieten ausgehende deutliche anterograde Markierung zum Septum, und zwar im gleichen Bereich, dem sich auch die Vasopressin-Terminalen zuordnen lassen.

Wie auf Seite 30 beschrieben, erbrachte die Injektion von Peroxidase in das laterale Septum keinen Nachweis von markierten Zellen im Nucleus suprachiasmaticus. Wir fanden den oben beschriebenen Faserzug und konnten markierte Zellen im Nucleus paraventricularis pars magnocellularis nachweisen. Nach Swanson und Kuypers (1980) lassen sich die markierten Zellen dem posterioren magnocellulären Teil sowie dem medialen parvocellulären Teil zuordnen. Es handelt sich hier um eine Untergruppe des Nucleus paraventricularis, von der sowohl vasopressinerge als auch oxytocinerge Faserverläufe zum Nucleus tractus solitarii und zum Nucleus dorsalis vagi ziehen (Sofroniew und Schrell 1981).

Ein weiterer Ursprungsort, der das laterale Septum vasopressinerg innervieren könnte, ist der Nucleus interstitialis der Stria terminalis, in dem van Leeuwen und Caffé (1983) vasopressinerge Neurone nachwiesen. Auch wir bekamen Peroxi-

dase-markierte Zellen in diesem Kern nach Injektion in das vasopressinerge Terminalgebiet des lateralen Septums. Conrad und Pfaff (1976 a und b) wiesen eine deutliche Projektion des Nucleus interstitialis zum lateralen Septum auf. Aber ebenso zeigten sie eine anterograde Projektion vom vorderen Hypothalamus ausgehend, die den Nucleus interstitialis durchzieht und im posterolateralen Teil des Septums endet. An der vasopressinergen Innervation des lateralen Septums sind demnach der Nucleus interstitialis der Stria terminalis und der Nucleus paraventricularis beteiligt, jedoch nicht der Nucleus suprachiasmaticus.

Die Amygdalakerne werden cytoarchitektonisch schon von Gurdjian (1928), Fox (1940) und Brodal (1947) beschrieben. Der Nucleus amygdaloideus medialis stellt eine umschriebene Zellansammlung von dichtgepackten Neuronen dar, die sich in eine rostrale und eine kaudale Gruppe zusammenfassen lassen (Krettek und Price 1978). Der Übergang von der kaudalen Amygdala zum ventralen Hippocampus wird durch ein schmales Kerngebiet gebildet, das ebenfalls aus dichtgepackten fusiformen Neuronen besteht. Eine sichere Abgrenzung zwischen dem Übergang von der kaudalen Amygdala zum ventralen Hippocampus wird in der Literatur nicht beschrieben (Shiosaka et al. 1983). Elektrophysiologischen Untersuchungen zufolge ist die Amygdala an autonomen Vorgängen, z.B. kardiovaskuläre und respiratorische Regulation, an der Steuerung von Speichelsekretion, an der gastrointestinalen Motilität und an der Ovulation beteiligt (Gloor 1955 und 1960, Kaada 1972).

Sofroniew und Weindl (1980 und 1981) beschreiben vasopressinerge Fasern vom Nucleus suprachiasmaticus zur medialen Amygdala. Ihre Aussage stützt sich auf die Analyse von immunhistochemischen Serienschnitten. Diese Fasern ziehen vom Nucleus suprachiasmaticus durch den lateralen Hypothalamus zur medialen Amygdala und enden im ventralen Hippocampus. Eine zweite vasopressinerge Innervation der medialen Amygdala

soll nach Bujis (1978) und Sofroniew und Weindl (1978 a und b) vom Nucleus paraventricularis ausgehen und über die Stria terminalis zur medialen Amygdala ziehen. Conrad und Pfaff (1976 a und b) beschrieben eine solche Verbindung nach Injektion von Tritium-markierten Aminosäuren in den Nucleus paraventricularis. Stephan et al. (1981) beschrieben in einer autoradiographischen Studie über den Nucleus suprachiasmaticus eine deutliche Fasermarkierung zur rostralen Amygdala, während in der medialen Amygdala keine Fasern nachgewiesen werden konnten. Dieser Befund steht in Einklang mit unseren Ergebnissen, die wir mittels des retrograden Peroxidase-Transportes erhalten haben. Eine efferente Verbindung vom Nucleus suprachiasmaticus zu diesen Kerngebieten besteht offenbar nicht, während eine Verbindung vom Nucleus paraventricularis zur Amygdala medialis nachgewiesen ist. Diese Interpretation gilt sowohl für das vasopressinerge Terminalgebiet des ventralen Hippocampus, das als Fortsetzung des Faserverlaufes der medialen Amygdala angesehen wird, als auch für die zentrale Amygdala.

Nachdem van Leeuwen und Caffé (1983) auch im medialen Amygdalakern vasopressinerge Neurone nachgewiesen haben, die als Ursprungsgebiete der vasopressinergen Terminalen der medialen Amygdala sowie des ventralen Hippocampus in Betracht kommen, bedarf es noch weiterführender Untersuchungen. Aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse und in Übereinstimmung mit der Literatur kann der Nucleus suprachiasmaticus nicht als Ursprungsgebiet von vasopressinergen Terminalen der Amygdalakerne angesehen werden.

4.2.2 Diencephalon

Der ventromediale Hypothalamus wurde vor mehr als 40 Jahren als ein hypothalamisches Zentrum erkannt, das am Appetenzverhalten beteiligt ist. Hetherington und Ranson (1940 und 1942) bewiesen, daß gezielte Läsionen in den ventromedialen

Hypothalamus zu Hyperphagie und Fettsucht führen. Anand und Brobeck (1951) zeigten, daß Läsionen im lateralen Hypothalamus zur Nahrungsaufnahmeverweigerung und Magersucht führen.

Werden diese beiden hypothalamischen Gebiete mittels Elektroden stimuliert, so zeigt sich bei den Versuchstieren ein entgegengesetztes Verhalten. Die Stimulation des lateralen Hypothalamus führt an vor dem Versuch gesättigten Tieren zu einer weiteren Nahrungsaufnahme, während die Stimulation des ventromedialen Hypothalamus zu einer Verweigerung der Nahrungsaufnahme führt, auch wenn den Tieren vor Versuchsbeginn die Nahrung für längere Zeit entzogen worden war (Anand und Dua 1955). Weitere pharmakologische, physiologische und neuroanatomische Aspekte des ventromedialen Hypothalamus führten unter anderem zu der Hypothese, daß ein Ungleichgewicht der Aktivität beider Kerngebiete an der Fettsucht beteiligt sein könnte (Bray et al. 1981).

Entsprechend den immunhistochemischen Ergebnissen (Sofroniew und Weindl 1978 a und b, 1981) lassen sich vasopressinerge Faserzüge und Terminalen im periventrikulären Anteil des hinteren Hypothalamus finden. Vasopressinerge Terminalen konnten hauptsächlich am Nucleus ventromedialis hypothalami und am Nucleus dorsomedialis hypothalami dargestellt werden.

Verbindungen vom Nucleus suprachiasmaticus zum Nucleus ventromedialis und zum Nucleus dorsomedialis hypothalami wurden von Swanson und Cowan (1975) autoradiographisch nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit denen von Conrad und Pfaff (1976 a). Luiten und Room (1980), die neuronale Verbindungen der hypothalamischen Kerngebiete mittels Meerrettich-Peroxidase-Injektion untersuchten, konnten nach Injektion in den Nucleus dorsomedialis und ventromedialis hypothalami im Nucleus suprachiasmaticus retrograd markierte Zellen zeigen. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang. Zusätzlich konnte durch die vergleichende Dünnschnitt-Technik gezeigt werden, daß es sich dabei um eine vasopressinerge Projektion handelt. Eine vom Nucleus supra-

chiasmaticus ausgehende vasopressinerge Innervation des Nucleus dorsomedialis und ventromedialis hypothalami gilt damit als gesichert.

Der Nucleus periventricularis thalami wird dem Epithalamus zugeordnet. Es besteht weder eine Verbindung zum Cortex noch zum Striatum. Er ist der einzige thalamische Kern, der nennenswerte noradrenerge Afferenzen erhält (Hökfelt et al. 1974). Die noradrenergen Faserzüge nehmen ihren Ausgang vom kaudalen Hirnstamm sowie vom Locus coeruleus (Moore und Bloom 1978). Enkephalin enthaltende Terminalen konnten im Nucleus periventricularis thalami nachgewiesen werden (Simantov et al. 1976, Watson et al. 1977). Es wird vermutet, daß dieses Kerngebiet am Schmerzverhalten beteiligt sein könnte.

Den immunhistochemischen Ergebnissen (Sofroniew und Weindl 1978 a und b, 1981) zufolge, läßt sich eine ausgeprägte vasopressinerge Innervation der Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis nachweisen (Tafel 2, Abb. 1, 3, 4, 5, 6). Eine efferente Verbindung vom Nucleus suprachiasmaticus zum Epithalamus, der die Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis thalami einschließt, wurde autoradiographisch von Swanson und Cowan (1975), von Conrad und Pfaff (1976 a und b) und von Stephan et al. (1981) beschrieben. Die Frage, welcher Teil des Nucleus suprachiasmaticus zu den oben beschriebenen Kerngebieten des Thalamus projiziert, konnte mittels der autoradiographischen Technik nicht beantwortet werden. Die hier angewandte Methode des retrograden Peroxidase-Transportes zeigt, daß ein rostrrodorsaler Zellanteil des Nucleus suprachiasmaticus zum mediodorsalen Thalamus projiziert. Eine vasopressinerge Innervation der Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis thalami wurde durch die vergleichende Dünnschnitt-Methode gesichert.

Die Habenula wird nach Gurdjian (1925) über die Stria medullaris mit dem olfaktorischen System verbunden. Marburg (1944) beschrieb die Habenula und ihre Faserverbindungen am menschlichen Gehirn. In neuerer Zeit konnten mittels der Degenerationsmethode weitere Faserverbindungen zur lateralen Habenula beschrieben werden. So konnte Nauta (1956) Verbindungen zum Septum darstellen, Kusama und Hagino (1961) zum Tuberculum olfactorium, Nauta (1958) zur lateralen präoptischen Region sowie zum Hypothalamus, Cragg (1961) zum Nucleus interpeduncularis und Conrad et al. (1974) zum mittleren und dorsalen Raphekern.

Bujis (1978) sowie Sofroniew und Weindl (1978 a und b, 1981) beschrieben in der lateralen Habenula am Übergang zur medialen Habenula vasopressinerge Terminalen, die ihren Ausgang vom Nucleus suprachiasmaticus nehmen sollen. Dieser Schluß scheint mit der Tatsache übereinzustimmen, daß das Terminalgebiet der lateralen Habenula nur vasopressinerge Terminalen enthält und in Verlängerung des ausschließlich vasopressinerg versorgten Gebietes des mediodorsalen Thalamus liegt.

Stephan et al. (1981) injizierten Tritium-markiertes Leucin in den Nucleus suprachiasmaticus und beschrieben unter anderem einen Faserzug zum ventralen Teil der lateralen Habenula. Inwieweit dieser Faserzug auch Terminalkontakte in der lateralen Habenula aufweist, konnten die Autoren aufgrund eines Artefaktes in diesem Gebiet nicht klären. Sie halten aber ein Terminalgebiet in diesem Bereich für wahrscheinlich. Berk und Finkelstein (1981 b), die sich derselben Methode bedienten, konnten eine anterograde Projektion vom Nucleus suprachiasmaticus zur lateralen Habenula nicht nachweisen, solange sich die Injektion auf das Kerngebiet des Nucleus suprachiasmaticus beschränkte. Erst bei Kontrollinjektion, die den anterioren Hypothalamus mit einschloß, konnten Faserzüge im medialen Teil der lateralen Habenula aufgezeigt werden. Es gilt dabei zu bedenken, daß im vorderen Hypothalamus sich Fasern vom Nucleus paraventricularis und vom Nucleus supra-

chiasmaticus vermischen und damit eine Unterscheidung der Ursprungsorte nicht zulassen. Herkenham und Nauta (1977) injizierten Peroxidase in unterschiedlichen Mengen in die laterale Habenula. Es fällt auf, daß eine möglicherweise vom Nucleus suprachiasmaticus oder vom Nucleus paraventricularis ausgehende Projektion nicht beschrieben ist. Die Injektionsstelle des Falles HB 13 (Herkenham und Nauta 1977) dürfte der Lokalisation des vasopressinergen Terminalgebietes der lateralen Habenula entsprechen und mit unserer Injektionsstelle übereinstimmen. Weder Herkenham und Nauta noch wir fanden einen Hinweis dafür, daß der Nucleus suprachiasmaticus als Ursprungsort der vasopressinergen Terminalen im lateralen Habenulakern in Frage kommt.

Übereinstimmend mit Herkenham und Nauta (1977) haben auch wir eine Zellgruppe im Nucleus interstitialis der Stria terminalis nachweisen können. Conrad und Pfaff (1976 a und b) beschrieben nach Injektion von Tritium-markierten Aminosäuren in den Nucleus interstitialis der Stria terminalis eine anterograde Projektion zur medialen und lateralen Habenula. Van Leeuwen und Caffé (1983) konnten an Colchizin vorbehandelten Ratten eine vasopressinerge Zellgruppe im Nucleus interstitialis der Stria terminalis zeigen. Im Hinblick auf eine fehlende retrograde Projektion zum Nucleus paraventricularis als auch zum Nucleus suprachiasmaticus ist damit der Nucleus interstitialis der Stria terminalis als Ursprungsort einer vasopressinergen Verbindung zur lateralen Habenula sehr wahrscheinlich.

4.2.3 Mesencephalon

Die Substantia grisea periventricularis stellt der Interpretation von Favrod und Kučera (1977) und Kučera und Favrod (1979) zufolge ein Bindeglied auf dem polysynaptisch verschalteten Weg vom Nucleus suprachiasmaticus zu den Kerngebieten des Hirnstammes dar.

Sofroniew und Weindl (1978 a und b, 1981) wiesen in der Substantia grisea periventricularis vasopressinerge und oxytocinerge Fasern nach. Diese durchziehen die Substantia grisea periventricularis weitläufig, ohne mit einer umschriebenen Zellgruppe Kontakt aufzunehmen und ohne ein dichteres Terminalgebiet zu bilden. Lichtmikroskopisch lassen sich Fasern finden, die mit dem Soma einzelner verstreut liegender Zellen in Verbindung treten. Lichtmikroskopischer Beurteilung zufolge könnte es sich hier um synaptische Kontakte handeln.

Kučera und Favrod (1979), die eine direkte Verbindung vom Nucleus suprachiasmaticus zur Substantia grisea periventricularis in der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) beschrieben, bekamen nach Injektion von 0,5 bis 1,0 µl 30%iger Meerrettich-Peroxidase markierte Zellen, die über den gesamten Nucleus suprachiasmaticus verstreut waren. Sie wiesen darauf hin, daß im mediodorsalen Teil des Kerngebietes die Peroxidase-markierten Zellen verdichtet zu sein scheinen und diese Zellgruppe mit der von Sofroniew und Weindl (1978 a und b) beschriebenen Vasopressin-produzierenden Neuronengruppe des Nucleus suprachiasmaticus in Übereinstimmung stehen könnte. Es sollte hier angemerkt werden, daß diese Studie bei einer anderen Spezies vorgenommen wurde, und daß Injektionen gleich großer Peroxidasmengen weit über die Substantia grisea centralis hinaus diffundieren mußten, vermutlich bis zum mediodorsalen Thalamus, von dem eine Projektion zum Nucleus suprachiasmaticus nachgewiesen ist. Vergleichsinjektionen in dieser Größenordnung ergaben bei der Ratte Markierungen im Nucleus suprachiasmaticus, die mit denen des mediodorsalen Thalamus übereinstimmen. Kleinere Injektionen führten ebenfalls zur Zelldarstellung im rostralen Anteil des Nucleus suprachiasmaticus. Mittels des vergleichenden Dünnschnittverfahrens konnte aber keine Übereinstimmung der Meerrettich-Peroxidase-markierten Zellen mit den Vasopressin enthaltenden Zellen gefunden werden.

Die von Kučera und Favrod (1979) sowohl anterograd als

auch retrograd dokumentierte direkte Verbindung des Nucleus suprachiasmaticus zur Substantia grisea centralis schließt unseren Ergebnissen zufolge einen Vasopressin-produzierenden Neuronenanteil des Nucleus suprachiasmaticus aus. Ursprung der vasopressinergen sowie der oxytocinergen Terminalen in der Substantia grisea centralis ist mit großer Wahrscheinlichkeit der Nucleus paraventricularis hypothalami. Die Peroxidase-markierte Neurone lassen sich in dessen dorsalen Anteil als parvocelluläre, vermutlich vasopressinerge und oxytocinerge Neurone identifizieren.

Die Nuclei raphes sind eine mittelständige Zellgruppe, die sich vom Mesencephalon über die Pons zur Medulla hin erstreckt (Taber et al. 1960). Diese Kerngebiete zeigen unterschiedliche Neuronenpopulationen (Valverde 1961, Fox et al. 1976). Mittels histochemischer Methoden haben Dahlström und Fuxe (1964) den Nachweis Serotonin enthaltender Neurone erbracht. Eine ausführliche topographische Darstellung der Serotonin enthaltenden Neurone des Raphekernes findet sich bei Steinbusch (1981), der Serotonin mittels eines spezifischen Antikörpers immunhistochemisch darstellte.

Sofroniew und Weindl (1981) beschrieben eine vasopressinerge Projektion, die vom Nucleus suprachiasmaticus ausgeht und am Nucleus raphes dorsalis endet. Auch diese Beurteilung erfolgte anhand der kleinkalibrigen axonalen Faserzüge. Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu den Befunden der autoradiographischen Studie von Conrad und Pfaff (1976 a). Unter Verwendung von Tritium-markiertem Leucin, das in die mediale präoptische Region (einschließlich des Nucleus suprachiasmaticus) injiziert wurde, konnten die Autoren keine durch anterograden Transport darstellbare Projektion zum Nucleus raphes dorsalis und Nucleus raphes magnus erkennen. Eine weitere Injektionsserie der beiden Autoren (Conrad und Pfaff 1976 b) mittels Tritium-markiertem Prolin in den Nucleus paraventricularis hypothalami erbrachte unter anderem den Nachweis einer Projektion zum Nucleus raphes dorsalis. Diese

Ergebnisse stimmen mit den hier vorgelegten nach retrogradem Transport von Peroxidase überein.

Autoradiographisch darstellbare Projektionen zum Nucleus raphes magnus wurden in der Literatur nicht beschrieben. Die Auffassung von Sofroniew und Weindl (1981), daß die vasopressinergen und oxytocinergen Projektionen zum Nucleus raphes magnus vom Nucleus paraventricularis stammen, konnte durch unsere Transportstudie bestätigt werden.

4.2.4 Pons

Der Locus coeruleus ist ein Kerngebiet im dorsalen Anteil des pontinen Tegmentums. Eine erste Beschreibung des Kerngebietes nach morphologischen Kriterien wurde von Russel (1955) unternommen. Neue Bedeutung erlangte dieses Kerngebiet, nachdem Falck et al. (1962) lichtmikroskopisch mittels der Aldehyd-induzierten Fluoreszenzmethode Katecholamine in diesem Kerngebiet nachweisen konnten. Dahlström und Fuxe (1964) beschrieben den Locus coeruleus als ein Zellgebiet, das ausschließlich aus noradrenergen Neuronen besteht. Lindvall und Björklund (1974) wiesen katecholaminerge Verbindungen des Locus coeruleus zum Di- und Telencephalon, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark nach. Swanson und Hartman (1975) benutzten zur Darstellung noradrenerger Neurone einen Antikörper, der gegen Dopamin- β -hydroxylase (DBH), das den letzten Schritt in der Biosynthese von Noradrenalin katalysiert, gerichtet ist. Mittels dieses Verfahrens konnte sichergestellt werden, daß nur solche Neurone zur Darstellung kamen, die aktiv an der Synthese von Noradrenalin beteiligt sind. Eine detaillierte morphologische Darstellung der Dopamin- β -hydroxylase enthaltenden Zellen des Locus coeruleus und eine Einteilung des Kerngebietes in Untergruppen wurden von Grzanna und Molliver (1980) veröffentlicht.

Die von Swanson (1977) sowie von Swanson und Hartman (1980) und von Sofroniew und Weindl (1981) beschriebenen vasopressi-

nergen und oxytocinergen Terminalen im Locus coeruleus sind über das gesamte Kerngebiet verteilt. Sofroniew und Weindl nahmen den Nucleus suprachiasmaticus als Ursprung der Terminalen an. Sakai et al. (1977) haben die Ergebnisse nach Injektion von Peroxidase in den Locus coeruleus der Katze ähnlich interpretiert. Sie fanden keine Markierung im Nucleus paraventricularis, wohl aber eine im Nucleus suprachiasmaticus. Die Autoren geben keine nähere Lokalisation der markierten Zellen innerhalb des Nucleus suprachiasmaticus an, zudem beschränken sie sich auf eine tabellarische Erwähnung.

Bei der Ratte konnten wir in Übereinstimmung mit Cedarbaum und Aghajanian (1978) keine Projektion zum Nucleus suprachiasmaticus nachweisen. Autoradiographische Untersuchungen (Berk und Finkelstein 1981 b) mit einer Injektion in den Nucleus suprachiasmaticus zeigen keine anterograde Projektion zum Locus coeruleus.

Vom Nucleus paraventricularis aus konnten Conrad und Pfaff (1976 b) autoradiographisch Projektionen zum Locus coeruleus und Nucleus parabrachialis dorsalis darstellen. Cedarbaum und Aghajanian (1978), die ähnlich wie wir Meerrettich-Peroxidase in den Locus coeruleus und dessen Umfeld injizierten, wiesen in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (neben anderen Regionen) Zellen im Nucleus paraventricularis sowie im Nucleus interstitialis der Stria terminalis nach.

Autoradiographisch wurde eine Verbindung vom Nucleus interstitialis der Stria terminalis zum Locus coeruleus erstmals von Swanson und Cowan (1975) im Gegensatz zu den Befunden von Conrad und Pfaff (1976 a und b) beschrieben. Die Bedeutung dieses Kerngebietes zur Erklärung der vasopressinergen Terminalen im Locus coeruleus wurde von van Leeuwen und Caffé (1983) aufgezeigt, nachdem Vasopressin-produzierende Neurone (nach Gabe von Colchizin) im Nucleus interstitialis der Stria terminalis nachgewiesen werden. Somit stehen sowohl der Nucleus paraventricularis als auch der Nucleus intersti-

tialis der Stria terminalis in der Interpretation des Ursprungsortes der vasopressinergen Terminalen zur Diskussion. Für eine Projektion vom Nucleus suprahypophysialis zum Locus coeruleus und zum Nucleus parabrachialis dorsalis ergaben sich keine Hinweise.

4.2.5 Medulla oblongata

Die Beteiligung des Hirnstammes an der kardiovaskulären Regulation wurde schon 1888 erkannt. Elektrophysiologische Versuche von Laborde (1888) gaben Hinweise auf eine kardioinhibitorische Funktion des Nucleus ambiguus. Abweichend zu diesen Ergebnissen wurde von Miller und Bowman (1916) der Nucleus dorsalis vagi des Hirnstammes als kardioinhibitorisches Zentrum beschrieben. Todo et al. (1977) berichteten, daß nach Injektion von Meerrettich-Peroxidase in die Schrittmacherregion des Herzens bei der Katze retrograd markierte Neurone im Nucleus dorsalis vagi sowie im Nucleus tractus solitarius, aber nicht im Nucleus ambiguus nachgewiesen werden konnten.

Markierungsversuche des zentralen Anteils des Nervus vagus mit Meerrettich-Peroxidase zeigten einen Ursprung dieser Fasern im Nucleus dorsalis vagi und im Nucleus ambiguus, nicht aber im Nucleus tractus solitarius (Nosaka et al. 1979, Sofroniew und Schrell 1981). Direkte autonome Neuronenverbindungen vom Nucleus paraventricularis zum Nucleus dorsalis vagi, Nucleus tractus solitarius und Nucleus ambiguus wurden von Saper et al. (1976), Conrad und Pfaff (1976 b) Armstrong et al. (1980) und Sofroniew und Schrell (1980 und 1981) beschrieben. Im Nucleus dorsalis vagi (Tafel 5, Abb. 1, 3, 4), im Nucleus tractus solitarius sowie im Nucleus ambiguus wird eine dichte Gruppierung von vasopressinergen und oxytocinergen Terminalen gefunden. Die Dichte der vasopressinergen Terminalen im Vergleich zu den oxytocinergen entspricht einer Verteilung von 1:4.

Der Nachweis, daß die vasopressinergen und oxytocinergen Terminalen vom kaudalen Anteil des Nucleus paraventricularis stammen, konnte durch die vergleichende Dünnschnittmethode für jedes dieser Terminalgebiete geführt werden. Die Lokalisation der Peroxidase-markierten Neurone entspricht dem von Swanson und Kuypers (1980) beschriebenen Neuronen des Nucleus paraventricularis, die direkt mit den autonomen Zentren der Medulla oblongata synaptisch verbunden sind.

4.3 Faserprojektionen des Nucleus supraopticus

Scharrer und Scharrer (1954 a und b) beschrieben mittels der Gomori-Färbung (Gomori 1941) ein neurosekretorisches Faserbündel vom Nucleus paraventricularis und vom Nucleus supraopticus zur Neurohypophyse. In dieser hypothalamo-hypophysären Bahn wurden von Zimmerman et al. (1973 a) neurohypophysäre Peptide immunhistochemisch nachgewiesen. In den magnocellulären Neuronen beider Kerngebiete lassen sich Vasopressin und Oxytocin in nahezu gleichen Anteilen nachweisen (Rhodes et al. 1981).

Nach Injektion von Peroxidase in den Hypophysenhinterlappen der Ratte konnten nahezu alle magnocellulären Neurone des Nucleus supraopticus dargestellt werden, hingegen im Nucleus paraventricularis nur die laterale und die mediale Kerngruppe (Sherlock et al. 1975).

Nach Injektion von Tritium-markierten Aminosäuren in den Nucleus paraventricularis und in den Nucleus supraopticus konnte gezeigt werden, daß sich die Projektionen der beiden Kerngebiete zum Infundibulum und zur Neurohypophyse gut voneinander trennen lassen (Alonso und Assenmacher 1981).

Axone des Nucleus paraventricularis enden in der Zona externa der Eminentia mediana und im peripheren Anteil der Neurohypophyse, während die Axone des Nucleus supraopticus durch die Zona interna der Eminentia mediana ziehen und im zentra-

len Anteil der Neurohypophyse enden (Alonso und Assenmacher 1981, Dierickx et al. 1976).

Von keiner der zahlreichen Injektionsstellen in dieser Untersuchung konnte eine Markierung von Neuronen im Nucleus supraopticus beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit der Literatur (s. o.), wonach direkte Faserprojektionen des Nucleus supraopticus vorwiegend zur Neurohypophyse bestehen. Im Gegensatz zum Nucleus paraventricularis gehen vom Nucleus supraopticus wenige extrahypophysäre Projektionen aus.

4.4 Beiträge zur funktionellen Bedeutung

Cushing (1932) berichtete über einen Versuch, in welchem er Hypophysenhinterlappen-Extrakt in den menschlichen Seitenventrikel injizierte und danach eine Vasodilatation und einen Abfall der Körpertemperatur beobachtete. Dieser Versuch demonstrierte, daß „Substanzen“ des Hypothalamus an der Regulation des autonomen Nervensystems beteiligt sind. Diese „Substanzen“ des Hypophysenhinterlappen-Extraktes, die sich später als Oxytocin und Vasopressin darstellen ließen, scheinen an einer Reihe von integrativen Funktionen des Gehirns wie Gedächtnisleistung und Lernverhalten, kardiovaskuläre Regulation und Schmerzverhalten, beteiligt zu sein.

Lernverhalten

Die Vermutung, daß neurohypophysäre Hormone das Lernen und die Gedächtnisleistung beeinflussen, wurde erstmals von De Wied (1969) geäußert, der das Verhalten von hypophysektomierten Ratten untersuchte. Die Verhaltensänderung, die daraufhin die Ratten zeigten, konnte mit Vasopressin kompensiert werden (De Wied 1969, Bohus et al. 1978, De Wied und Bohus 1966, De Wied 1971). Läsionsversuche im Septum und im anterodorsalen Hippocampus (Van Wimersma Grei-

danus et al. 1979) zeigten, daß am Lernverhalten auch extra-hypothalamische Gebiete beteiligt sind. Nach Thompson (1978) sind ventraler Hippocampus, kaudales Septum, Amygdala und mediodorsaler Thalamus für Gedächtnisleistungen zuständig. Ventraler Hippocampus, kaudales Septum und Amygdala erhalten vasopressinerge Terminalen vom Nucleus paraventricularis, hingegen der mediodorsale Thalamus vom Nucleus suprachiasmaticus.

Gedächtnisleistung

Weiterführende Versuche, die darin bestanden, daß Mikroinjektionen von Vasopressin in die genannten Kerngebiete appliziert wurden, gaben weiteren Aufschluß über das Lernverhalten. So fanden Kovačs et al. (1979 a und b, 1980) eine Konsolidierung der Lernprozesse, wenn Vasopressin in das dorsale Septum, den Hippocampus oder in den Nucleus raphes dorsalis injiziert wurde, während Injektionen in den zentralen Amygdalakern keinen Effekt zeigten. Nach Gabe von Vasopressin-Antiserum in den dorsalen Raphekern und in den Hippocampus ging das Erlernte wieder verloren (Kovačs et al. 1980 und 1982).

Die elektrische Stimulation des dorsalen Raphekernes führt zu einer Unterbrechung der Gedächtnisleistung (Fibiger et al. 1978). Weiterführende Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß die Funktionen der Gedächtnisleistung durch Katecholamine modifiziert werden können (Versteeg et al. 1979).

Kardiovaskuläre Regulation

Oliver und Schäfer (1895) waren die ersten, die aus dem Hypophysenhinterlappen gewonnenen Substanzen vasoaktive Eigenschaften zusprachen. Basierend auf den Beobachtungen von Cushing (1932) (s.S. 74), injizierten Nashold et al. (1963) Vasopressin in den Seitenventrikel von Katzen. Bei geringer

Dosierung wurde Blutdruckabfall, bei höherer Dosierung Blutdrucksteigerung beobachtet. Der immunhistochemische Nachweis, daß vasopressinerge und oxytocinerge Fasern des Nucleus paraventricularis nicht nur zur Neurohypophyse, sondern auch zum Mittelhirn, Hirnstamm und Rückenmark ziehen, ließ eine weitere Interpretation zu, wonach Vasopressin auch auf neuronalem Wege an der vaskulären Regulation beteiligt ist. In einer Reihe von Kerngebieten, die zur kardiovaskulären Steuerung beitragen, wie Nucleus tractus solitarii, Nucleus commissuralis, Nucleus dorsalis vagi, Nucleus lateralis reticularis, Locus coeruleus und Nucleus intermediolateralis des Rückenmarks, wurde Vasopressin und Oxytocin nachgewiesen (Palkovits und Zaborsky 1977, Palkovits et al. 1979).

Ergebnisse von Koizumi und Yamashita (1978) sowie Yamashita und Koizumi (1979), zeigen eine Beteiligung des Nucleus paraventricularis an der vaskulären Steuerung. Nach Stimulation des Nervus vagus und des Sinus Caroticus treten Änderungen der elektrischen Aktivität im Nucleus paraventricularis wie auch im Nucleus supraopticus auf.

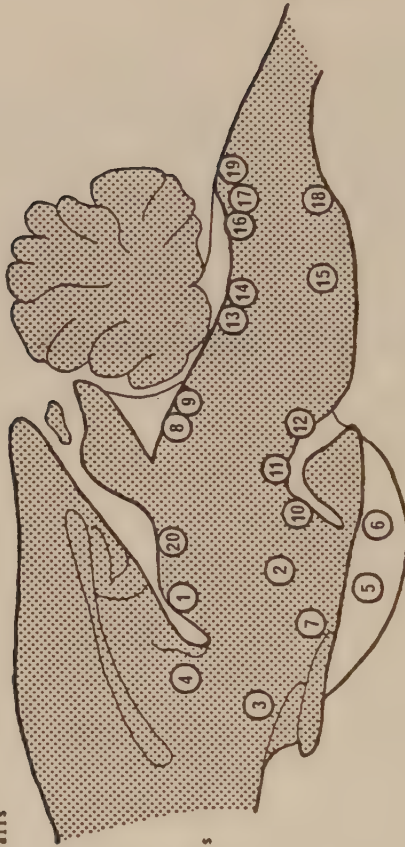
Bei bestimmten Formen des Bluthochdrucks wurden veränderte Vasopressinblutspiegel gefunden (Crofton et al. 1979, Möhring et al. 1980 a). Nach Möhring et al. (1980 b) soll ein blutdrucksteigernder Effekt von zirkulierendem Vasopressin nur dann auftreten, wenn der autonome kardiovaskuläre Regelkreis gestört ist. Der Beweis dafür ist bis heute noch nicht erbracht. Nosaka et al. (1979) haben mittels Peroxidase-Injektionen präganglionäre kardioinhibitorische Neurone des herzinnervierenden Vagusastes dargestellt. Durch Sofroniew und Schrell (1981) konnte gezeigt werden, daß Neurone des kardioinhibitorischen Vagusastes von Oxytocin- und Vasopressin-Terminalen innerviert werden, die vom Nucleus paraventricularis stammen. Diese immunhistochemisch darstellbare Kette vom Nucleus paraventricularis zum Nucleus dorsalis vagi und über den Nervus vagus zum Herzen, könnte ein Bindeglied in der Funktionskette des kardiovaskulären Regelkreises, wie von Möhring et al. (1980) postuliert, sein.

BILDTEIL ZUR DISKUSSION

1	Mpr / ps	Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellato-cellularis Thalami
2	Nvm / dm	Nuclei ventromedialis et dorsomedialis Hypothalami
3	WTD	Nucleus Tractus diagonalis Broca
4	Nsl	Nucleus septi lateralis
5	Nam	Nucleus amygdaloideus medialis
6	Hipv	Hippocampus pars ventralis
7	Nac	Nucleus amygdaloideus centralis
8	Sgp	Substantia grisea periventricularis
9	Nrd	Nucleus raphe dorsalis
10	Nsm	Nucleus supramammillaris
11	Nip	Nucleus interpeduncularis
12	Sn	Substantia nigra
13	Npd	Nucleus parabrachialis dorsalis
14	Lc	Locus coeruleus
15	Nrm	Nucleus raphe magnus
16	Nts	Nucleus tractus solitarius
17	Ndv	Nucleus dorsalis vagi
18	Nrl	Nucleus reticularis lateralis
19	Ncm	Nucleus commissuralis
20	Nhl	Nucleus habenulae lateralis
		Nucleus paraventricularis hypothalami
		Nucleus suprachiasmaticus

Tafel I:

Übersichtsdarstellung über die Terminal- und Injektionsgebiete.
Verzeichnis der in diesen Tafeln benutzten Abkürzungen.



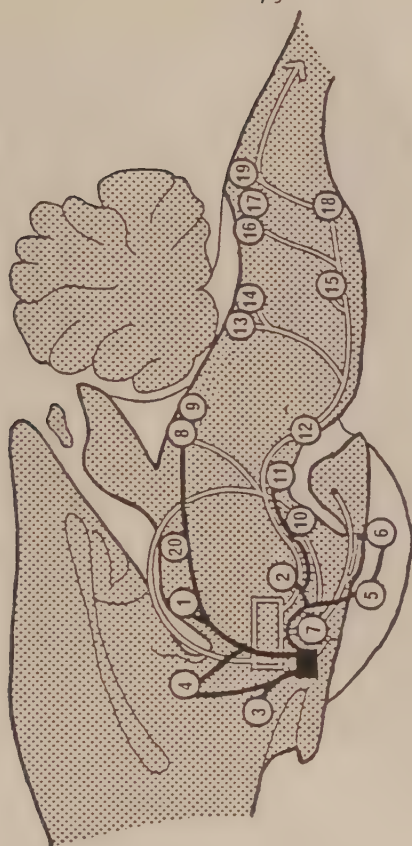
Projektionen ausgehend vom
Nucleus suprachiasmaticus

1	Npr / ps	8	Sgp
2	Nvm / dm	9	Ndr
3	NTdB	10	Nsm
4	Nsl	11	Nip
5	Nam	20	Nhl
6	Hipv		

Projektionen ausgehend vom
Nucleus paraventricularis

7	Nac	15	Nrm
8	Sgp	16	Mts
9	Nrd	17	Mdv
12	Sn	18	Nrl
13	Npd	19	Ncm
14	Lc		

02



Tafel II:

Übersichtsdarstellung der vasopressinergen Terminalgebiete und der ursprünglich postulierten Verbindungen, ausgehend vom Nucleus suprachiasmaticus oder Nucleus paraventricularis hypothalami.

Projektionen ausgehend vom
Nucleus suprachiasmaticus

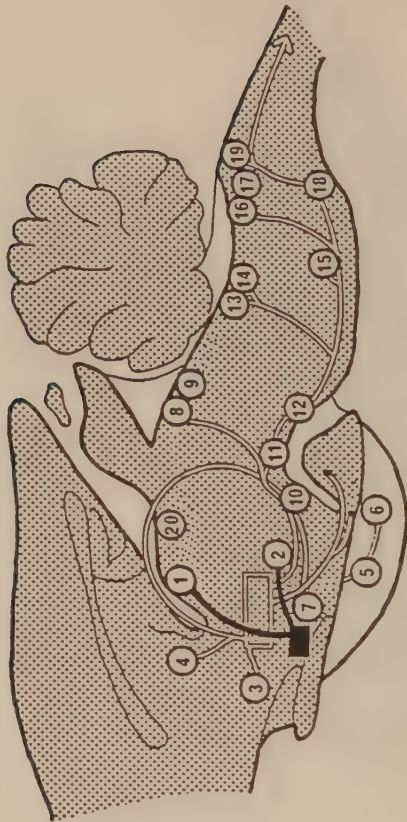
- 1 Mpr / ps
2 Nvm / dm

Projektionen ausgehend vom
Nucleus paraventricularis

- 3 NTd8 9 Mrd 15 Nrm
4 Nsl 10 Msm 16 Nts
5 Nam 11 Nlp 17 NdV
6 Hipv 12 Sn 18 NrI
7 Mac 13 Npd 19 Ncm
8 Sgp 14 Lc

Projektionen ausgehend vom
Nucleus interstitialis der Stria terminalis

- 20 Mhl



Tafel III:

Übersichtsdarstellung über die Ergebnisse dieser Arbeit.
Abgrenzung der vasopressinergen Verbindungen des
Nucleus suprachiasmaticus von denen des Nucleus para-
ventricularis hypothalamici durch die retrograde Trans-
portstudie.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1. Ziel dieser Untersuchung war eine genauere Aufschlüsselung der Herkunft von Vasopressin enthaltenden Nervenfasern, deren Terminalen in zahlreichen Kerngebieten innerhalb und außerhalb des Hypothalamus enden. Aufgrund rein morphologischer Kriterien war vermutet worden, daß vom Nucleus suprachiasmaticus Projektionen zu folgenden Kernen ausgehen: im Telencephalon Nuclei septi lateralis, Nucleus amygdaloideus medialis und lateralis, Hippocampus pars ventralis, im Diencephalon Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis thalami, Nucleus habenulae lateralis, im Mesencephalon Substantia grisea periventricularis, Nucleus raphes dorsalis. Sowohl der Nucleus suprachiasmaticus als auch der Nucleus paraventricularis waren als Ursprung von Projektionen zu einer weiteren Gruppe von Kernen in Betracht gezogen worden: in der Pons Locus coeruleus, Nucleus parabrachialis dorsalis, in der Medulla oblongata Nucleus tractus solitarii, Nucleus dorsalis vagi, Nucleus ambiguus.
2. Meerrettich-Peroxidase wurde stereotaktisch in sehr kleinen Volumina (0,05 bis 0,15 μ l) injiziert und in noch geringerer Menge iontophoretisch über Glaskapillaren in die oben beschriebenen Kerngebiete appliziert. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Peroxidase-Nachweises wurde anstelle der gebräuchlichen enzymatischen Methode ein immunhistochemisches Verfahren verwandt, bei dem Antikörper gegen die Proteinstruktur des Peroxidase-Moleküls (vom Kaninchen gewonnen) eingesetzt wurden. Zur exakten Identifizierung der Projektionen von Vasopressin-Neuronen wurde auf konsekutiven Paraffinschnitten (1,5 μ) alternierend retrograd transportierte Peroxidase und endogenes Peptid (Vasopressin) dargestellt.

3. a) Vom Nucleus suprachiasmaticus verlaufen vasopressinerge Projektionen nur zu den Nuclei ventromedialis et dorsomedialis hypothalami und zu den Nuclei periventricularis rotundocellularis et stellatocellularis thalami.
- b) Vom Nucleus paraventricularis hypothalami gehen vasopressinerge Projektionen zu den oben beschriebenen Kerngebieten des Telencephalon, des Mesencephalon, der Pons und der Medulla oblongata aus.
- c) Die in den Nuclei habenulae laterales beobachteten vasopressinergen Terminalen entstammen weder dem Nucleus paraventricularis noch dem Nucleus suprachiasmaticus. Ihr Ursprung wird in den Perikaryen des Nucleus interstitialis der Stria terminalis angenommen.
- d) Vom Nucleus supraopticus wurden - im Gegensatz zum Nucleus paraventricularis - in dieser Untersuchung Faserverbindungen lediglich zum Hypophysenhinterlappen beobachtet.

Die kombinierte immunhistochemische retrograde Transportstudie hat ergeben, daß die Vielzahl (s.o.) der ursprünglich aufgrund morphologischer Kriterien vermuteten vasopressinergen Projektionen des Nucleus suprachiasmaticus sich auf zwei zentrale Projektionen reduzieren läßt. Damit beschränken sich mögliche neuromodulatorische Effekte des vasopressinergen Neuronenteils des Nucleus suprachiasmaticus ausschließlich auf das Diencephalon.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, J.C., WARR, W.B.:

Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injection of horseradish peroxidase.

J. Comp. Neurol. 170: 107-122 (1976).

ALONSO, G., ASSENMACHER, I.:

Radioautographic studies on the neurophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat.

Cell Tiss. Res. 219: 525-534 (1981).

ANAND, B.K., BROBECK, J.R.:

Hypothalamic control of food intake in rats and cats.

Yale J. Biol. Med. 24: 123-140 (1951).

ANAND, B.K., DUA, S.:

Feeding responses induced by electrical stimulation of the hypothalamus in the cat.

Indian J. Med. Res. 43: 113-122 (1955).

ANTUNES, J.L., CARMEL, P.W., ZIMMERMAN, E.A.:

Projections from the paraventricular nucleus to the zona externa of the median eminence of the rhesus monkey: an immunohistochemical study.

Brain Res. 137: 1-10 (1977).

ARMSTRONG, W.E., HATTON, G.I.:

The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophyseal injections of HRP.

Brain Res. Bull. 5: 473-477 (1980).

ARMSTRONG, W.E., WARACH, S., HATTON G.I., McNEILL, T.H.:

Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis.

Neuroscience 5: 1931-1958 (1980).

BARGMANN, W.:

Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse.

Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 34: 610-634 (1949).

BARGMANN, W., KNOOP, A.:

Elektronenmikroskopische Betrachtungen an der Neurohypophyse.

Z. Zellforsch. 46: 241-251 (1957).

BERK, M.L., FINKELSTEIN, J.A.:

Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain.

Neuroscience 6: 1601-1624 (1981a)

BERK, M.L., FINKELSTEIN, J.A.:

An autoradiographic determination of the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus.

Brain Res. 226: 1-13 (1981b)

BLEIER, R., COHN, P., SIGGELKOW, I.R.:

A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat.

In: Handbook of the hypothalamus. Anatomy of the hypothalamus. Vol. 1. Ed. by Morgane P.J., Panksepp, J.

Marcel Dekker, Inc. New York, Basel 137-220 (1977).

BOHUS, B., KOVÁCS, G.L., DE WIED, D.:

Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes.

Brain Res. 157: 414-417 (1978).

BRAY, G.A., INOUT, S., NISHIHAWA, Y.:

Hypothalamic obesity: the autonomic hypothesis and the lateral hypothalamus.

Diabetologia 20: 366-367 (1981).

BROADWELL, R.D., BRIGHTMAN, M.W.:

Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous system from extracerebral and cerebral blood.

J. Comp. Neurol. 166: 257-284 (1976).

BRODAL, A.:

The amygdaloid nucleus in the rat.

J. Comp. Neurol. 87: 1-16 (1947).

BUGNON, C., FELLMAN, D., GOUGET, A., CARDOT, J.:

Corticoliberin in the rat brain: immunocytochemical identification and localization of a novel neuroglandular system.

Neurosci. Lett. 30: 25-30 (1982).

BUIJS, R.M.:

Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord.

Cell Tissue Res. 192: 423-435 (1978).

BUNT, A.H., LUND, R.D., LUND, J.S.:

Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase by ganglion cells of the albino rat retina.

Brain Res. 73: 215-228 (1976).

CAFFÉ, D.R., VAN LEEUWEN, F.W.:

Vasopressin-immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat.

Cell. Tiss. Res. 233: 23-33 (1983).

CEDARBAUM, J.M., AGHAJANIAN, G.K.:

Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique.

J. Comp. Neur. 178: 1-16 (1978).

CHRIST, J.F.:

Derivation and boundaries of the hypothalamus, with atlas of the hypothalamic grisea.

In: The Hypothalamus. Ed. by Haymaker, W., Anderson, E., Nauta, H.

Ch.C. Thomas, Springfield, pp. 13-60 (1969).

CONRAD, L.C.A., LEONARD, C.M., PFAFF, D.W.:

Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: An autoradiographic and degeneration study.

J. Comp. Neurol. 156: 179-205 (1974).

CONRAD, L.C.A., PFAFF, D.W.:

Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. - I. An autoradiographic study of the medial preoptic area.

J. Comp. Neurol. 169: 185-220 (1976a).

CONRAD, L.C.A., PFAFF, D.W.:

Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. - II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus.

J. Comp. Neurol. 169: 221-262 (1976b).

CRAGG, B.G.:

The connections of the habenula in the rabbit.

Exp. Neurol. 3: 388-409 (1961).

CROFTON, J.T., SHARE, L., SHADE, R.E., LER-KWON, W.J., MANNING, M., SAWYER, W.H.:

The importance of vasopressin in the development and maintenance of DOC-salt hypertension in the rat.

Hypertension 1: 31-38 (1979).

CROSBY, E.C., SHOWERS, M.J.C.:

Comparative anatomy of the preoptic and hypothalamic areas.

In: The Hypothalamus. Ed. by Haymaker, W., Anderson, E., Nauta, W.J.H.

Ch. C. Thomas, Springfield, pp. 61-135 (1969).

CUSHING, H.:

Paper relating to the pituitary body.

In: Hypothalamus and Parasympathetic Nervous System.

Ed. by C.C. Thomas.

C.C. Thomas, Springfield, (1932).

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K.:

Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system.

Acta Physiol. Scand. 62, Suppl. 232: 1-55 (1964).

DE FRANCE, J.F.:

The septal nuclei.

Plenum, New York (1976).

DE WIED, D.:

Effects of peptide hormones on behaviour.

In: Frontiers in Neuroendocrinology. Ed. by Ganong, W.F., Martini, L.

Oxford University Press, London, pp. 97-140 (1969).

DE WIED, D.:

Long term effect of vasopressin on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats.

Nature (Lond.) 232: 58-60 (1971).

DE WIED, D., BOHUS, B.:

Long term and short term effects on retention of a conditioned avoidance response in rats by treatment with long acting Pitressin and Alpha-MSH.

Nature (Lond.) 212: 1484-1486 (1966).

DIEPEN, R.:

Der Hypothalamus.

In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Vo. IV/7. Herausg. von Bargmann, W.

Springer, Berlin (1962).

DIERICKX, K., VANDESANDE, F., DE MEY, J.:

Identification in the external region of the rat median eminence, of separate neurophysin-vasopressin and neurophysin-oxytocin-containing nerve fibres.

Cell.Tissue Res. 168: 141-151 (1976).

DORNHORST, A., CARLSON, D.E., SEIF, S.M., ROBINSON, A.G., ZIMMERMAN, E.A., GANN, D.S.:

Control of release of adrenocorticotropin and vasopressin by the supraoptic and paraventricular nuclei.

Endocrinology 108: 1420-1424 (1978).

DU VIGNEAUD, V.:

Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin.

Harvey Lectures 50: 1-26 (1954).

FALCK, B., HILLARP, N.A., THIEME, G., TORP, A.:

Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde.

J. Histochem. Cytochem. 10: 348-354 (1962).

FAVROD, P., KUČERA, P.:

An afferent pathway of the suprachiasmatic nucleus of the woodmouse.

Experientia 33: 779 (1977)

FIBIGER, H.C., LEPIANE, F.G., PHILLIPS, A.G.:

Disruption of memory produced by stimulation of the dorsal raphe nucleus: mediation by serotonin.

Brain Res. 155: 380-386 (1978).

FOX, C.A.:

Certain basal telencephalic centers in the cat.

J. Comp. Neurol. 72: 1-62 (1940).

FOX, G.Q., PAPPAS, G.D., PUPURA, D.P.:

Morphology and fine structure of the feline neonatal medullary raphe nuclei.

Brain Res. 101: 385-410 (1976).

FUXE, K.:

Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 64, Suppl. 247: 37-85 (1965).

GLOOR, P.:

Electrophysiological studies on the connections of the amygdaloid nucleus in the cat.

Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 7: 243-264 (1955).

GLOOR, P.:

Amygdala.

In: *Handbook of Physiology*, Sect. 1, Vol. 2. Ed. by Field, J., Magoun, H.W., Hall, V.E.

American Physiological Society, Washington, pp. 1395-1420 (1960).

GOMORI, G.:

Observations with differential stains on human islets of Langerhans.

Amer. J. Pathol. 17: 395-406 (1941).

GOODPASTURE, E.W.:

The axis-cylinders of peripheral nerves as portals of entry to the central nervous system for the virus of herpes simplex in experimentally infected rabbits.

Amer. J. Path. 1: 11-28 (1925).

GRAHAM, R.C., KARNOVSKY, M.J.:

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of the mouse kidney. Ultrastructural correlates by a new technique.

J. Histochem. Cytochem. 14: 291-302 (1966).

GRZANNA, R., MOLLIVER, M.E.:

The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation.

Neuroscience 5: 21-40 (1980).

GUDDEN, VON B.:

Beiträge zur Kenntnis des Corpus Mammillare und der sogenannten Schenkel des Fornix.

Arch. Psychiat. Nervenkr. 11: 428-452 (1881).

GURDJIAN, E.S.:

Olfactory connections in the albino rat, with special references to the stria medullaris and the anterior commissure.

J. Comp. Neurol. 38: 128-163 (1925).

GURDJIAN, E.S.:

The diencephalon of the albino rat. II. Studies on the brain of the rat.

J. Comp. Neurol. 43: 1-114 (1927).

GURDJIAN, E.S.:

The corpus striatum of the rat. Studies on the brain of the rat, No. 3.

J. Comp. Neurol. 45: 249-281 (1928).

HARDY, H., HEIMER, L.:

A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde and anterograde axonal transport of HRP.

Neurosci. Lett. 5: 235-240 (1977).

HARTMANN, J.F.:

Electronmicroscopy of the neurohypophysis in normal histamin-treated rats.

Z. Zellforsch. 48: 291-308 (1958).

HEDREEN, J.C., McGRATH, S.:

Observations on labeling of neuronal cell bodies, axons, and terminals after injection of horseradish peroxidase into the rat brain.

J. Comp. Neurol. 176: 225-246 (1977).

HENDRICKSON, A.E., WAGONER, N., COWAN, W.M.:
An autoradiographic and electron microscopic study of
retino-hypothalamic connections.
Z. Zellforsch. 135: 1-26 (1972).

HERKENHAM, M., NAUTA, W.J.H.:
Afferent connections of the habenular nuclei in the rat.
A horseradish peroxidase study with a note on the
fiber-of-passage problem.
J. Comp. Neurol. 173: 123-146 (1977).

HETHERINGTON, A.W., RANSON, S.W.:
Hypothalamic lesions and adiposity in the rat.
Anat. Rec. 78: 149-172 (1940).

HETHERINGTON, A.W., RANSON, S.W.:
The relation of various hypothalamic lesions to adiposity
in the rat.
J. Comp. Neurol. 76: 475-499 (1942).

HÖKFELT, T., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., JOHANSSON, O.:
Immunohistochemical evidence for the existence of
adrenaline neurons in the rat brain.
Brain Res. 66: 235-251 (1974).

IBUKA, N., KAWAMURA, H.:
Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in
the rat by suprachiasmatic nucleus lesions.
Brain Res. 96: 76-81 (1975).

JOHNSON, R.T., MIMS, C.A.:
Pathogenesis of viral infections of the nervous system.
New Engl. J. Med. 278: 23-30 (1968).

JONES, E.G., HARTMAN, B.K.:
Recent advances in neuroanatomical methodology.
Ann. Rev. Neurosci. 1: 215-296 (1978).

KAADA, B.R.:

Stimulation and regional ablation of the amygdaloid complex with reference to functional representations.
In: The Neurology of the Amygdala. Ed. by Eleftheriou, B.E.
Plenum Press, New York, pp. 205-281 (1972).

KEEFER, D.A.:

Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported detailed dendritic marker.
Brain Res. 140: 15-32 (1978).

KIM, C.C., STRICK, P.L.:

Critical factors involved in the demonstration of horseradish peroxidase retrograde transport.
Brain Res.:103: 356-361 (1976).

KNIGGE, K.M., SILVERMAN, A.J.:

Anatomy of the endocrine hypothalamus.
In: Handbook of Physiology, Endocrinology.
Am. Physiol. Soc. 4, sect. 7: 1-32 (1974).

KÖNIG, J.F.R., KLIPPEL, R.A.:

The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.
E. Krieger Publishing Co. Inc., Huntington New York (1967).

KOH, E.T., RICARDO, J.A.:

Paraventricular nucleus of the hypothalamus: anatomical evidence of the functionally discrete subdivisions.
Soc. Neurosci. Abstr. 6: 521 (1980).

KOIZUMI, K., YAMASHITA, H.:

Influence of atrial stretch receptors on hypothalamic neurosecretory neurons.
J. Physiol. (Lond.) 285: 341-358 (1978).

KOVÁCS, G.L., BOHUS, B., VERSTEEG, D.H.G.:

The effect of vasopressin on memory processes: the role of noradrenergic neurotransmission.

Neuroscience 4: 1529-1537 (1979 a).

KOVÁCS, G.L., BOHUS, B., VERSTEEG, D.H.G., DE KLOET, E.R., DE WIED, D.:

Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic midbrain structures.

Brain Res. 175: 303-314 (1979 b).

KOVÁCS, G.L., BOHUS, B., VERSTEEG, D.H.G.:

The interaction of posterior pituitary neuropeptides with monoaminergic neurotransmission: significance in learning and memory processes.

In: Adaptive capabilities of the nervous system.

Ed. by MCCONELL, P.S., BOER, C.J., ROMIJN, H.J., VAN DE POLL, N.E., CORNER, M.A.

In: Progress in Brain Res. 53: 123-140 (1980).

KOVÁCS, G.L., BOHUS, B., VERSTEEG, D.H.G., TELEGDY, G., DE WIED, D.:

Neurohypophyseal hormones and memory.

In: Advances in Pharmacology and Therapeutics II, Vol. I.

Ed. by Yoshida, H., Hagihara, Y., Ebashi, S.

CNS Pharmacology, Neuropeptides, Pergamon Press, Oxford, pp. 175-187 (1982).

KRETTEK, J.E., PRICE, J.L.:

Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat.

J. Comp. Neurol. 178: 225-254 (1978).

KRIEG, W.J.S.:

The hypothalamus of the albino rat.

J. Comp. Neurol. 55: 19-90 (1932).

KRISTENSSON, K.:

Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves.

Acta neuropath. (Berlin) 16: 293-300 (1970).

KRISTENSSON, K., OLSSON, Y.:

Retrograde axonal transport of protein.

Brain Res. 29: 363-365 (1971).

KRISTENSSON, K., OLSSON, Y.:

Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 1. Time relationships between transport and induction of chromatolysis.

Brain Res. 79: 101-109 (1974).

KRISTENSSON, K., OLSSON, Y.:

Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 2. Relations between rate of transfer from the site of injury to the perikaryon and onset of chromatolysis.

J. Neurocytol. 4: 653-661 (1975).

KRISTENSSON, K., OLSSON, Y.:

Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 3. Entry into injured axons and subsequent localization in perikaryon.

Brain Res. 115: 201-213 (1976).

KUČERA, P., FAVROD, P.:

Suprachiasmatic nucleus projection to mesencephalic central grey in the woodmouse (*Apodemus sylvaticus* L.). Neuroscience 4: 1705-1715 (1979).

KUSAMA, T., HAGINO, N.:

Medial forebrain bundle and stria medullaris in rabbits. Folia Psychiat. Neurol. Jap. 15: 229-245 (1961).

KUYPERS, H.G.J.M., KIEVIT, J., GROEN-KLEVANT, A.C.:

Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in rat's forebrain.

Brain Res. 67: 211-218 (1974).

LABORDE , J.V.:

Du noyau d'origine, dans le bulbe rachidien des fibres motrices ou cardiaques du nerf pneumogastrique, ou noyau cardiaque.

Arch. Physiol. Norm. Pathol. 4: 397-417 (1888).

LA VAIL, L.:

The retrograde transport method.

Fed. Proc. 34: 1618-1624 (1975).

LINDVALL, O., BJÖRKLUND, A.:

The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain.

Acta Physiol. Scand., Suppl. 412: 1-48 (1974).

LUITEN, P.G.M., ROOM, P.:

Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study.

Brain Res. 190: 321-332 (1980).

MAI, J.K., JUNGER, E.:

Quantitative autoradiographic light- and electron microscopic studies on the retino-hypothalamic connections in the rat.

Cell Tiss. Res. 183: 221-237 (1977).

MALMGREEN, L., OLSSON, Y.:

A sensitive method for histochemical demonstration of horseradish peroxidase in neurones following retrograde axonal transport.

Brain Res. 148: 279-294 (1978).

MARBURG, O.:

The structure and fiber connections of the human habenula.

J. Comp. Neurol. 80: 211-233 (1944).

MESULAM, M.M.:

The blue reaction product in HRP neurohistochemistry: incubation parameters and visibility.

J. Histochem. Cytochem. 24: 1273-1320 (1976).

MILLER, F.R., BOWMAN, J.T.:

The cardio-inhibitory center.

Am. J. Physiol. 39: 149-153 (1916).

MÖHRING, J., ARBOGAST, R., DÜSING, R., GLÄNZER, K.,

KINTZ, J., LIARD, J.E., MACIEL, J.A., MONTANI, J.P.,

SCHOUN, J.:

Vasopressor role of vasopressin in hypertension.

In: Ferring Symposium on Brain and Pituitary Peptides.

Ed. by Wuttke, W., Weindl, A., Voigt, K., Dries R.R.

Karger, Basel (1980 a).

MÖHRING, J., SCHOUN, J., KINTZ, J., MCNEILL, R.:

Decreased vasopressin content in brain stem of rats
with spontaneous hypertension.

Arch. Pharmacol. 315: 83-84, (1980 b).

MOORE, R.Y.:

Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative
study.

Brain Res. 49: 403-409 (1973).

MOORE, R.Y., BLOOM, F.E.:

Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology
of the dopamine systems.

Annu. Rev. Neurosci. 1: 129-169 (1978).

MOORE, R.Y., EICHLER, V.B.:

Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm
following suprachiasmatic lesions in the rat.

Brain Res. 42: 201-206 (1972).

MOORE, R.Y., HALARIS, A.E., JONES, B.E.:

Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections.

J. Comp. Neurol. 180: 417-438 (1978).

MOORE, R.Y., LENN, N.J.:

A retinohypothalamic projection in the rat.

J. Comp. Neurol. 146: 1-14 (1972).

MORAX, V., MARIE, A.:

Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique.
Ann. Inst. Pasteur 17: 335-342 (1903).

NASHOLD, B.S., JR., MANNARINO, E.M., ROBINSON, R.R.:
Effect of posterior pituitary polypeptides on the flow
of urine after injection in lateral ventricle of the
brain of a cat.
Nature (Lond.) 194: 293 (1963).

NAUTA, W.J.H.:

An experimental study of the fornix system in the rat.
J. Comp. Neurol. 104: 247-271 (1956).

NAUTA, W.J.H.:

Hippocampal projections and related neural pathways to
the midbrain in the cat.
Brain 81: 319-340 (1958).

NISHINO, H., KOIZUMI, K., McBROOKS, C.:

The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus
in the production of circadian rhythm.
Brain Res. 112: 45-59 (1976).

NOSAKA, S., YAMAMOTO, T., YASUNAGA, K.:

Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic
neurons within rat brain stem.
J. Comp. Neurol. 186: 79-92 (1979).

OLIVER, G., SCHÄFER, E.A.:

On the physiological action of extracts of pituitary body
and certain other glandular organs.
J. Physiol. (Lond.) 18: 277-279 (1895).

PALAY, S.L.:

The fine structure of the neurohypophysis.
In: Ultrastructure and cellular chemistry of neuronal
tissue. Ed. by Waelsch, H.
Hoeber, New York, pp. 31-49 (1957).

PALKOVITS, M., ZÁBORSKY, L.:

Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. In: Hypertension and Brain Mechanisms. Ed. by De Jong, W., Provoost, A.P., Shapiro, A.P. Progr. Brain Res. 47: 9-34, Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1977).

PALKOVITS, M., MEZEY, E., ZÁBORSKY, L.

Neuroanatomical evidences for direct neural connections between the brain stem baroreceptor centers and the forebrain areas involved in the neural regulation of blood pressure.

In: Nervous system and hypertension. Ed. by Meyer, P., Schmitt, H.

Wiley Flammarion, Paris, pp. 18-30 (1979).

PELLEGRINO, L.J., PELLEGRINO, A.S., CUSHMAN, A.J.:

A stereotaxic atlas of the rat brain.

Plenum Press, New York und London (1967).

PETERSON, R.P.:

Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. J. Comp. Neurol. 128: 181-190 (1966).

POPA, G.T., FIELDING, U.:

A portal circulation from the pituitary to hypothalamic region. J. Anat. 65: 88-91 (1930).

POPA, G.T., FIELDING, U.:

Hypophysiportal vessels and their colloid accompaniment. J. Anat. 67: 227-232 (1933).

RAISMAN, G.:

The connexions of the septum.

Brain 89: 317-348 (1976).

RENNKE, H.G., VENKATACHALAM, M.A.:

Chemical modification of horseradish peroxidase.

J. Histochem. Cytochem. 27: 1352-1353 (1979).

RHODES, C.H., MORRELL, J.I., PFAFF, D.W.:
Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in
rat hypothalamus: Distribution and numbers of neurophysin,
oxytocin and vasopressin containing cells.
J. Comp. Neurol. 198: 45-64 (1981).

ROMEIS, B.:
Mikroskopische Technik, 16. Aufl.
Oldenbourg, München (1968).

RUSSELL, G.V.:
The nucleus locus coeruleus (dorsolateralis tegmenti).
Tex. Rep. Biol. Med. 13: 939-988 (1955).

SAKAI, K., TOURET, D., SALVERT, D., LEGER, L., JOUVET, M.:
Afferent projections to the cat locus coeruleus as
visualized by the horseradish peroxidase technique.
Brain Res. 119: 21-41 (1977).

SAPER, C.B., LOEWY, A.D., SWANSON, L.W., COWAN, W.M.:
Direct hypothalamo-autonomic connections.
Brain Res. 117: 305-312 (1976).

SAWCHENKO, P.E., SWANSON, L.W.:
Immunohistochemical identification of neurons in the para-
ventricular nucleus of the hypothalamus, that project to the
medulla as to the spinal cord in the rat.
J. Comp. Neurol. 205: 260-272 (1982).

SCHARRER, E.:
Stammt alles Kolloid im Zwischenhirn aus der Hypophyse?
Frankf. Ztschr. Pathol. 47: 134-142 (1934 a).

SCHARRER, E.:
Über die Beteiligung des Zellkerns an sekretorischen Vor-
gängen in Nervenzellen.
Frankf. Ztschr. Pathol. 47: 143-151 (1934 b).

SCHARRER, E., SCHARRER, B.:

Secretory cells within the hypothalamus.

Res. Publ. Assoc. Res. Nervous Mental Disease

20: 170- 194 (1940).

SCHARRER, E., SCHARRER, B.:

Hormones produced in neurosecretory cells.

Recent Progr. Hormone Res. 10: 183-240 (1954 a).

SCHARRER, E., SCHARRER, B.:

Neurosekretion.

In: Handb. Mikrosk. Anatomie 5: 953-1066, Berlin:

Springer Verlag (1954 b).

SHERLOCK, D.A., FIELD, P.M., RAISMAN, G.:

Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat.

Brain Res. 88: 403-414 (1975).

SCHRELL, U., Sofroniew, M.V.:

Use of serial 1-2 mikrometer paraffin sections in neuropeptide immunocytochemistry for sequential analysis of different substances contained within the same neurons. J. Histochem. Cytochem. 30: 512-516 (1982).

SCHWARTZ, J.H.:

Axonal transport: components, mechanism and specificity.

Ann. Rev. Neurosci. 2: 467-504 (1979).

SHIOSAKA, S., SAKANAKA, M., INAGAKI, S., SENBA, E., HARA, Y., TAKATSUKI, K., TAKAGI, H., KAWAI, Y., TOHYAMA, M.:

Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways.

In: Chemical Neuroanatomy. Ed. by Emson, P.C.

Raven Press, New York (1983).

SIMANTOV, R., SNOWMAN, A.M., SNYDER, S.H.:

A morphine-like factor "enkephalin" in rat brain:

Subcellular localization.

Brain Res. 107: 650-657 (1976).

SKOWSKY, W.R., FISHER, D.A.:

The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules.

J. Lab. Clin. Med. 80: 134-144 (1972).

SOFRONIEW, M.V.:

Vascular and neural projections of hypothalamic neurons producing neurohypophyseal or ACTH-related peptides.

In: Vasopressin, Corticoliberin and ACTH-related Peptides. Ed. by Baertschi, A.J., Dreifuss, J.J.

Academic Press, New York, (1982).

SOFRONIEW, M.V., MADLER, M., MÜLLER, O.A., SCRIBA, P.C:

A method for the consistent production of high quality antisera to small peptide hormones.

Fresenius Z. Anal. Chem. 290: 163 (1978).

SOFRONIEW, M.V., SCHRELL, U.:

Hypothalamic neurons projecting to the rat caudal medulla oblongata, examined by immunoperoxidase staining of retrogradely transported horseradish peroxidase.

Neurosci. Lett. 19: 257-263 (1980).

SOFRONIEW, M.V., SCHRELL, U.:

Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons.

Neurosci. Lett. 22: 211 (1981)

SOFRONIEW, M.V., SCHRELL, U.:

Long-term storage and regular repeated use of diluted antisera in glass staining jars for increased sensitivity, reproducibility and convenience of single- and two-color light microscopic immunocytochemistry.

J. Histochem. Cytochem. 30: 504-511 (1982).

SOFRONIEW, M.V., WEINDL, A.:

Extrahypothalamic neurophysin-containing perikarya, fiber pathways and fiber clusters in the rat brain. *Endocrin.* 102: 334-337 (1978a).

SOFRONIEW, M.V., WEINDL, A.:

Projections from the parvocellular vasopressin- and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus.

Am. J. Anat. 153: 391-430 (1978b).

SOFRONIEW, M.V., WEINDL, A.:

Identification of parvocellular vasopressin and neurophysin neurons in the suprachiasmatic nucleus of a variety of mammals including primates.

J. Comp. Neurol. 193: 659-675 (1980).

SOFRONIEW, M.V., WEINDL, A.:

Central nervous system distribution of vasopressin, oxytocin, and neurophysin.

In: Endogenous peptides and learning and memory processes. Ed. by Martinez, J.L., JR., Jensen, R.A., Messing, R.B., Rigter, H., McGaugh, J.L.

Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco (1981).

SOFRONIEW, M.V., WEINDL, A., SCHRELL, U., WETZSTEIN, R.:

Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain.

Acta histochemica, Suppl.-Bd. 24: 79-95 (1981).

STEINBUSCH, H.W.M.:

Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6: 557 - 618 (1981).

STEINWALL, O., KLATZO, I.:

Selective vulnerability of blood-brain barrier in chemically induced lesions.

J. Neuropath. Exp. Neurol. 25: 542-559 (1966).

STEPHAN, F.K., BERKLEY, K.J., MOSS, R.L.:

Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 6: 2625-2641 (1981).

STEPHAN, F.K., ZUCKER, I.:

Circadian rhythm in drinking behaviour and locomotor activity of the rats are eliminated by hypothalamic lesions.

Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 1583-1586 (1972).

STERNBERGER, L.A.:

Immunocytochemistry.

Prentice Hall, Englewood Cliffs (1974).

STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J., MEYER, H.G.:

The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase complex) and its use in identification of spirochetes.

J. Histochem. Cytochem. 18: 313-333 (1970).

STILLMAN, M.A., RECHT, L.D., ROSARIO, S.L., SEIF, S.M.,

ROBINSON, A.G., ZIMMERMAN, E.A.:

The effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on vasopressin and neurophysin in the zona externa of the median eminence of the rat.

Endocrinol. 101: 42-49 (1977).

STRAUS, W.:

Cleavage of heme from horseradish peroxidase by methanol with inhibition of enzymic activity.

J. Histochem. Cytochem. 22: 908-915 (1974).

SWANSON, L.W.:

Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

Brain Res. 128: 356-363 (1977)

SWANSON, L.W., COWAN, M.W.:

The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus.

J. Comp. Neurol. 160: 1-12 (1975).

SWANSON, L.W., COWAN, M.W.:

The connections of the septal region in the rat.

J. Comp. Neurol. 186: 621-656 (1979).

SWANSON, L.W., HARTMAN, B.K.:

The central adrenergic system. A immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine- β -hydroxylase as a marker.

J. Comp. Neurol. 163: 467-506 (1975).

SWANSON, L.W., HARTMAN, B.K.:

Biochemical specificity in central pathways related to peripheral and intracerebral homeostatic function.

Neurosci. Lett. 16: 55-60 (1980).

SWANSON, L.W., KUYPERS, H.G.J.M.:

The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods.

J. Comp. Neurol. 194: 555-570 (1980).

SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E.:

The paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and anatomic mechanisms.

Neuroendocrinology, 31: 410-417 (1980)

SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E.:

Hypothalamic integration. Organization of the paraventricular and supraoptic nucleus.

Ann. Rev. Neurosci. 6: 269-324 (1983).

TABER, E., BRODAL, A., WALBERG, F.:

The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion.

J. Comp. Neurol. 114: 161-187 (1960).

THOMPSON, R.:

Localization of a "passive avoidance memory system" in the white rat.

Physiological Psychology 6: 263-274 (1978).

TODO, K., YAMAMOTO, T., SATOMI, H., ISE, H., TAKATAMA, H., TAKAHASHI, K.,:

Origin of vagal preganglionic fibers to the sino-atrial and atrio-ventricular node regions in the cat heart as studied by the horseradish peroxidase method.

Brain Res. 130: 545-550 (1977).

VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E., ROSS, G.T.:

A method for producing antisera with small doses of immunogen.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988 (1971).

VALE, W., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J.:

Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin

Science 213: 1394-1397 (1981).

VALVERDE, F.:

Reticular formation of the pons and medulla oblongata.

A Golgi study.

J. Comp. Neurol. 116: 71-99 (1961).

VAN DEN POL, A.:

The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of the rat: intrinsic organization.

J. Comp. Neurol. 206: 317-345 (1982).

VANDESANDE, F., DIERICKX, K.:

Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat.

Cell Tissue Res. 164: 153-162 (1975).

VANDESANDE, F., DIERICKX, K., DE MEY, J.:

The identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei.

Cell Tissue Res. 156: 377-380 (1975).

VANDESANDE, F., DIERICKX, K., DE MEY, J.:

The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis.

Cell Tissue Res. 180: 443-452 (1977).

VAN DEURS, B.:

Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of the cerebral microvasculature in adult mice.

Brain Res. 124: 1-8 (1977).

VAN DYKE, H.B., CHOW, B.F., GREEP, R.O., ROTHEN, A.:

The isolation of a protein from the pars neuralis of the ox pituitary with constant oxytocic, pressor and diuresis-inhibitory activities.

J. Pharmacol. 74: 190-209 (1942).

VANEGAS, H., HOLLÄNDER, H., DISTEL, H.:

Early stages of uptake and transport of horseradish peroxidase by cortical structures, and its use for the study of local neurons and their processes.

J. Comp. Neurol. 177: 193-212 (1978).

VAN LEEUWEN, F.W., CAFFÉ, R.:

Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat.

Cell Tissue Res. 228: 525-534 (1983).

VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.B., CROISET, G., BAKKER, E.,
BOWMAN, H.:

Amygdaloid lesions block: the effect of neuropeptides
(vasopressin, ACTH₄₋₁₀) on avoidance behaviour.

Physiology and Behaviour 22: 291-295 (1979).

VERSTEEG, D.H.G., DE KLOET, E.R., VAN WIMERSMA
GREIDANUS, T.B., DE WIED, D.:

Vasopressin modulates the activity of catecholamine
containing neurons in specific brain regions.

Neurosci. Lett. 11: 69-73 (1979).

Vogt, M.O.:

Sur un faisceau septo-thalamique.

C. R. Soc. Biol. (Paris) 50: 206-207 (1898).

WATSON, S., AKIL, H., SULLIVAN, S., BARCHAS, J.:

Immunocytochemical localization of methionine enkephalin:
Preliminary observations.

Life Sci. 21: 733-738 (1977).

WEINDL, A., SOFRONIEW, M.V.:

Immunohistochemical localization of hypothalamic peptide
hormones in neural target areas.

In: Brain and Pituitary Peptides. Ed. by Wuttke, W., Weindl, A.
Voigt, K.H., Dries, R.-R.

S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney,
97-109 (1980).

WEISZ, P.A., HISCOE, H.:

Experiments on the mechanism of nerve growth.

J. Exp. Zool. 107: 315-396 (1948).

YAMASHITA, H., KOIZUMI, K.:

Influence of carotid and aortic baroreceptors on
neurosecretory neurons in supraoptic nuclei.

Brain Res. 170: 259-277 (1979).

ZIMMERMAN, E.A., SU, V.C., ROBINSON, A.G., CARMEL, P.W.,
FRANTZ, A.G., TANNENBAUM, M.:

Studies of neurophysin secretory neurons with immunoperoxidase
technique employing antibody to bovine neurophysin I. Light
microscopic findings in monkey and bovine tissue.

Endocrinol. 92: 931-940 (1973a).

ZIMMERMAN, E.A., CARMEL, P.W., HUSAIN, M.K., FERIN, M.,
TANNENBAUM, M., FRANTZ, A.G., ROBINSON, A.G.:

Vasopressin and neurophysin: high concentrations in
monkey hypophyseal portal blood.

Science 182: 925-927 (1973b).

ZIMMERMAN, E.A., STILLMAN, M.A., RECHT, L.D., ANTUNES, J.L.,
CARMEL, P.W., GOLDSMITH, P.C.:

Vasopressin and corticotropin-releasing factor:
an axonal pathway to portal capillaries in the zona
externa of the median eminence containing vasopressin
and its interaction with adrenal corticoids.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 297: 405-419 (1977).

Herrn Prof. Dr. med. R. Wetzstein danke ich für die Überlassung des Themas, für die großzügige Bereitstellung von Forschungsmitteln und für die Durchführung der Arbeit in der Anatomischen Anstalt (Mikroskopische Anatomie) der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Dr. med. habil. A. Weindl, Oberarzt an der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München, danke ich für seine Unterstützung in allen Stadien dieser Arbeit und für die Anleitung in der neuroanatomischen Arbeitsweise.

LEBENS LAUF

In Halvestorf/Hamel n wurde ich am 10.03.1950 als Sohn von Heinrich und Eva Schrell, geb. Zinke geboren.

Besuch der Volksschule in Remscheid von 1956 bis 1961.

Von 1961 bis 1970 Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums der Ernst-Moritz-Arndt-Schule in Remscheid mit abschließender Reifeprüfung.

Dienst bei der Bundeswehr von 1970 bis 1974.

Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München von 1976 bis 1983.

Staatsexamen im Mai 1983.

Approbation im Mai 1983.

Studium der Philosophie und Kunstgeschichte an der Ludwig-Maximilians-Universität in München von 1978 bis 1983.

Seit Juni 1983 Assistent an der Neurochirurgischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen.

